

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Pavlína Nekvasilová

MUTANTNÍ GLYKOSIDASY S VYSOKOU SUBSTRÁTOVOU SPECIFITOU A JEJICH ANALÝZA

Mutant glycosidases with a high substrate specificity and their
analysis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2019

Diplomová práce byla vypracována na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, Laboratoř biotransformací.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Mikrobiologický ústav AV ČR, je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne.....

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí práce RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D., za trpělivost, ochotu a podporu v během zpracování diplomové práce. Zejména bych ráda poděkovala za cenné rady při sepisování této práce. Děkuji své konzultantce, doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. Děkuji prof. Ing. Vladimírovi Křenovi, DrSc., za umožnění práce v Laboratoři biotransformací. Dále děkuji RNDr. Heleně Pelantové, Ph.D. za měření a interpretaci NMR spekter a Ing. Lucii Petráskové, Ph.D., za HPLC analýzy.

Abstrakt

β -*N*-Acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52, GH20) jsou retenující *exo*-glykosidasy, které *in vivo* odštěpují jak β -*N*-acetylglukosamin (GlcNAc), tak β -*N*-acetylgalaktosamin (GalNAc) z glykosylovaných struktur. Za vhodných reakčních podmínek jsou tyto enzymy schopné glykosidovou vazbu i syntetizovat. Cílenou mutagenézí v aktivním centru enzymu lze např. dosáhnout změny substrátové specifity nebo potlačit hydrolytickou aktivitu enzymu ve prospěch syntézy.

Předkládaná práce se zabývá třemi mutantními β -*N*-acetylhexosaminidasami z *Talaromyces flavus*. V jejich aktivním centru byla provedena záměna aminokyselinových zbytků, které jsou zodpovědné za vazbu hydroxylu na C-4 substrátu (Arg218, Glu546), za aminokyseliny navržené na základě molekulárního modelování. Byl studován vliv vnesených jednobodových mutací na substrátovou specifitu připravených enzymů. Mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasy byly heterologně exprimovány v *Pichia pastoris* a charakterizovány. Dále byly provedeny transglykosylační reakce s těmito enzymy. Připravené sacharidové produkty byly charakterizovány pomocí NMR.

Klíčová slova: β -*N*-acetylhexosaminidasa, enzymová syntéza, heterologní exprese, *Pichia pastoris*, *Talaromyces flavus*

Abstract

β -*N*-acetylhexosaminidases (EC 3.2.1.52, GH 20) are retaining *exo*-glycosidases that *in vivo* cleave both β -*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) or β -*N*-acetylgalactosamine (GalNAc) residues from glycostructures. Under suitable reaction conditions, these enzymes are able to synthesize the glycosidic bond in good yields. Substitution of selected amino acid(s) in the enzyme active site by site-directed mutagenesis may change the enzyme's substrate specificity or suppress the hydrolytic activity of the enzyme in favor of synthesis.

The present thesis deals with three mutant β -*N*-acetylhexosaminidases from *Talaromyces flavus*, in which the amino acid residues responsible for binding to C-4 hydroxyl of the substrate (Arg218, Glu546) were exchanged for amino acids proposed on the basis of molecular modeling. The effect of introduced single point mutations on substrate specificity of prepared enzymes was studied. Mutant β -*N*-acetylhexosaminidases were heterologously expressed in *Pichia pastoris* and characterized. Furthermore, transglycosylation reactions with these enzymes were performed. The prepared carbohydrate products were characterized by NMR.

Keywords: β -*N*-acetylhexosaminidase, enzymatic synthesis, heterologous expression, *Pichia pastoris*, *Talaromyces flavus*

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1. TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1. Enzymy užívané k syntéze glykosidové vazby	11
1.1.1. Glykosidasy (glykosidhydrolasy)	11
1.1.2. Glykosyltransferasy	13
1.1.3. Ostatní enzymy užívané pro syntézu glykosidové vazby	14
1.1.4. Mutantní enzymy využívané pro syntézu glykosidové vazby	14
1.2. β -N-Acetylhexosaminidasy	15
1.2.1. Zařazení β -N-acetylhexosaminidas do systému enzymů	15
1.2.2. Struktura a mechanismus β -N-acetylhexosaminidas	16
1.2.2.1. Rodina GH3	16
1.2.2.2. Rodina GH20	17
1.2.2.3. Rodina GH84	17
1.2.3. Výskyt a funkce β -N-acetylhexosaminidas	18
1.2.3.1. Bakteriální β -N-acetylhexosaminidasy	18
1.2.3.2. Rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy	18
1.2.3.3. Fungální β -N-acetylhexosaminidasy	19
1.2.3.4. Živočišné β -N-acetylhexosaminidasy	21
1.2.3.5. Lidské β -N-acetylhexosaminidasy	21
1.3. <i>Talaromyces flavus</i>	22
1.4. β -N-Acetylhexosaminidasa z <i>Talaromyces flavus</i>	23
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1. Seznam použitých chemikálií	26
3.2. Seznam roztoků a médií	28
3.3. Seznam komerčních setů	30
3.4. Přístrojové vybavení	30
3.5. Metody	31

3.5.1.	Polymerasová řetězová reakce (PCR) s mutantními primery.....	31
3.5.2.	Transformace plazmidu do <i>Escherichia coli</i>	33
3.5.2.1.	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> Top10	33
3.5.2.2.	Postup transformace a množení kolonií	34
3.5.2.3.	Izolace plazmidu v analytickém množství	34
3.5.2.4.	Izolace plazmidu v preparativním množství	35
3.5.3.	Expres mutantních β -N-acetylhexosaminidas v <i>P. pastoris</i>	36
3.5.3.1.	Příprava kompetentních buněk <i>P. pastoris</i>	36
3.5.3.2.	Příprava plazmidu a transformace do <i>P. pastoris</i>	37
3.5.3.3.	Analýza produkce β -N-acetylhexosaminidas v koloniích <i>P. pastoris</i>	37
3.5.3.4.	Kryokonzervace <i>P. pastoris</i>	38
3.5.4.	Produkce mutantních β -N-acetylhexosaminidas v <i>P. pastoris</i>	38
3.5.4.1.	Expres β -N-acetylhexosaminidas v <i>P. pastoris</i>	38
3.5.4.2.	Zpracování narostlých kultur a purifikace β -N-acetylhexosaminidas.....	39
3.5.5.	Charakterizace mutantních β -N-acetylhexosaminidas.....	39
3.5.5.1.	Stanovení čistoty a koncentrace proteinů	39
3.5.5.2.	Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidas	40
3.5.5.3.	Stanovení kinetických parametrů β -N-acetylhexosaminidas	42
3.5.6.	Enzymová syntéza sacharidů.....	42
3.5.6.1.	Metody analýzy reakčních směsí sacharidů	42
3.5.6.2.	Disacharid β -D-GlcNAc(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-N ₃	43
3.5.6.3.	Disacharid 6'-O-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc	44
3.5.6.4.	Trisacharid β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-6'-O-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc	45
3.5.6.5.	Zpracování reakčních směsí a izolace produktů	46
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
4.1.	Příprava a charakterizace mutantních β -N-acetylhexosaminidas z <i>Talaromyces flavus</i>	47
4.1.1.	<i>TfHex</i> E546H.....	47
4.1.1.1.	Analýza produkce <i>TfHex</i> E546H v koloniích <i>P. pastoris</i>	49
4.1.1.2.	Produkce a purifikace <i>TfHex</i> E546H	50

4.1.1.3.	pH a teplotní optimum <i>Tf</i> Hex E546H	52
4.1.1.4.	Vliv organických rozpouštědel na aktivitu <i>Tf</i> Hex E546H	53
4.1.1.5.	Vliv solí na aktivitu <i>Tf</i> Hex E546H.....	54
4.1.1.6.	Enzymová kinetika <i>Tf</i> Hex E546H.....	55
4.1.2.	<i>Tf</i> Hex E546Q.....	56
4.1.2.1.	pH a teplotní optimum <i>Tf</i> Hex E546Q	58
4.1.2.2.	Vliv organických rozpouštědel na aktivitu <i>Tf</i> Hex E546Q	58
4.1.2.3.	Vliv solí na aktivitu <i>Tf</i> Hex E546Q.....	60
4.1.2.4.	Enzymová kinetika <i>Tf</i> Hex E546Q.....	61
4.1.3.	<i>Tf</i> Hex R218K.....	62
4.1.3.1.	pH a teplotní optimum <i>Tf</i> Hex R218K.....	64
4.1.3.2.	Vliv organických rozpouštědel na aktivitu <i>Tf</i> Hex R218K.....	64
4.1.3.3.	Vliv solí na aktivitu <i>Tf</i> Hex R218K	66
4.1.3.4.	Enzymová kinetika <i>Tf</i> Hex R218K	67
4.2.	Porovnání vlastností rekombinantních β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas.....	68
4.3.	Transglykosylační reakce.....	69
4.3.1.	Příprava disacharidu β -D-GlcNAc(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-N ₃	69
4.3.2.	Příprava disacharidu 6'- <i>O</i> -Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc.....	71
4.3.3.	Příprava trisacharidu β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-6'- <i>O</i> -Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- D-GlcNAc	73
5.	ZÁVĚR.....	77
	Přílohy	87
	Příloha 1 Nukleotidové sekvence β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas.....	87
	Příloha 2 NMR analýzy připravených oligosacharidů.....	91
	Příloha 3	97

Seznam použitých zkratek

Aminokyseliny jsou značeny tří- či jednopísmennými zkratkami dle IUPAC.

3D	Třidimenzionální
A ₂₆₀	Absorbance při 260 nm
A ₂₈₀	Absorbance při 280 nm
AoHex	β -N-acetylhexosaminidasa z <i>Aspergillus oryzae</i>
BSA	Hovězí sérový albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAZy	<i>Carbohydrate Active Enzymes</i>
CCF	<i>Culture Collection of Fungi</i>
CMP	Cytidinmonofosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
GDP	Guanosindifosfát
GalNAc	β -N-acetylgalaktosamin
GlcNAc	β -N-acetylglukosamin
HexA, HexB	Lidské β -N-acetylhexosaminidasy rodiny GH20 (Hexosaminidasa A, Hexosaminidasa B)
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IUB-MB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
MOPS	3-(N-Morfolino)propansulfonová kyselina
MS	Hmotnostní spektrometrie (<i>Mass Spectrometry</i>)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)

OGA	Lidská O-GlcNAcase rodiny GH84
OGT	O-GlcNActransferasa
ot./min	Otáčky za minutu (<i>rpm</i>)
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PCR	Polymerasová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Polyethylen
<i>PoHex</i>	β -N-acetylhexosaminidasa z <i>Penicillium oxalicum</i>
<i>pNP</i> -GalNAc	<i>p</i> -nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosid
<i>pNP</i> -GlcNAc	<i>p</i> -nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid
SDS	Dodecylsíran sodný (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
TAE pufr	Tris-acetát-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethyldiamin
TIM barel	Strukturní motiv složený z osmi α -helixů a osmi β -listů
TDP	Thimidindifosfát
TFB	Transformační pufr (<i>Transformation Buffer</i>)
<i>TfHex</i>	β -N-Acetylhexosaminidasa z <i>Talaromyces flavus</i>
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridindifosfát

1. TEORETICKÁ ČÁST

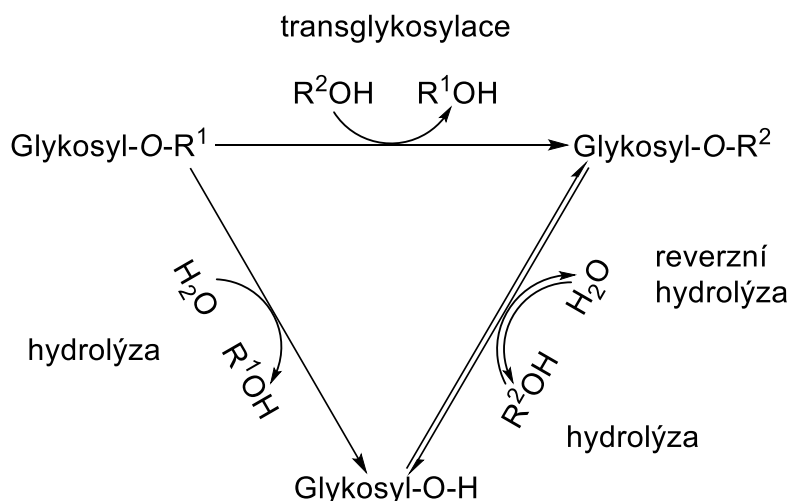
1.1. Enzymy užívané k syntéze glykosidové vazby

Enzymy katalyzující vznik glykosidové vazby lze rozdělit do čtyř skupin, a to glykosyltransferasy, transglykosidasy, glykosidfosforylasy a glykosidasy (glykosidhydrolasy).

1.1.1. Glykosidasy (glykosidhydrolasy)

Glykosidasy (EC 3.2) jsou enzymy, které přirozeně štěpí glykosidovou vazbu mezi dvěma sacharidy nebo mezi sacharidem a aglykonem. Podle způsobu štěpení lze glykosidasy rozdělit na *exo*-glykosidasy, které štěpí sacharidové jednotky z neredukujícího konce sacharidu, a *endo*-glykosidasy, štěpící glykosidovou vazbu uvnitř řetězce [1].

Glykosidasy jsou kromě hydrolýzy schopné *in vitro* katalyzovat i syntetické reakce. Hlavními nevýhodami použití glykosidas v syntéze je nízká regioselektivita a nízká výtěžnost reakcí. Vyšších výtěžků a posunu rovnováhy ve prospěch syntézy lze dosáhnout přidáním organického rozpouštědla nebo anorganických solí [2]. Většina glykosidas používaných pro syntetické účely jsou *exo*-glykosidasy. Přenášena je pouze monosacharidová jednotka z neredukujícího konce substrátu. Donorem glykosylu může být monosacharid, oligosacharid nebo glykosid aktivovaný vhodnou odstupující (aromatickou) skupinou. Reakce probíhá přes glykosyl-enzymový intermediát, který může být zachycen buď vodou za vzniku hydrolytického produktu nebo akceptorem za vzniku nového glykosidu či oligosacharidu (probíhá syntéza glykosidové vazby). Dalším způsobem vzniku glykosidu je reverzní hydrolýza [3], což je kondenzace volného monosacharidu s jiným volným sacharidem či aglykonem za odloučení molekuly vody a vzniku glykosové vazby, viz Obr. 1.

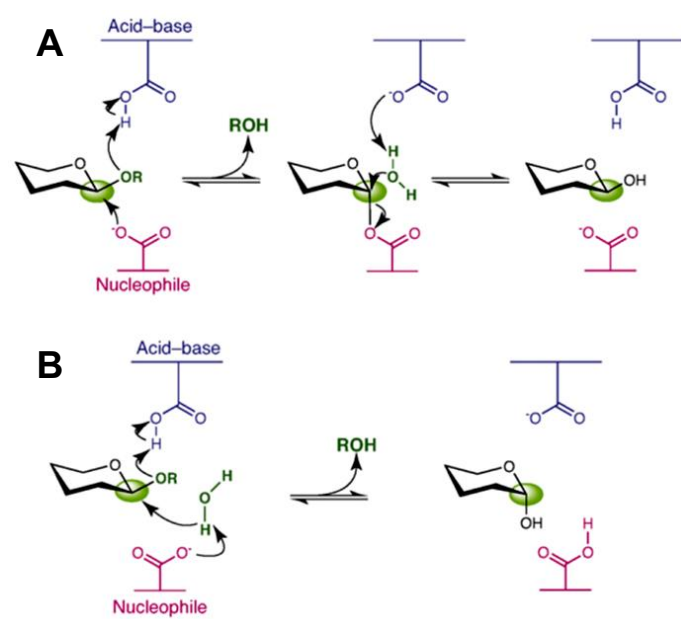


Obrázek 1 Schéma reakcí katalyzovaných glykosidasami. Převzato a upraveno z [2].

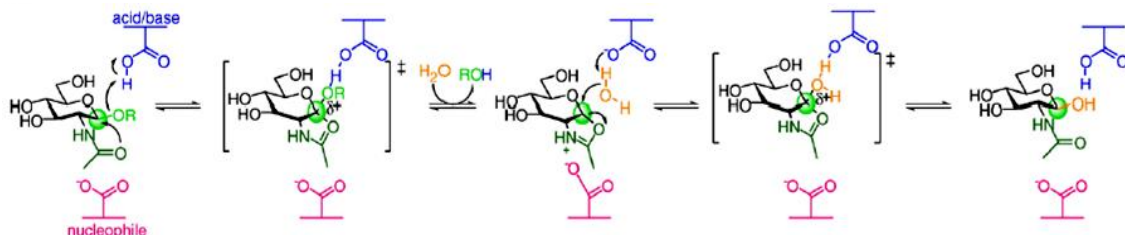
Glykosidasy lze rozdělit podle mechanismu hydrolyzy na retenující (zachovávající anomerní konfiguraci) a invertující (převracějící anomerní konfiguraci). Katalytický mechanismus hydrolyzy retenujícími glykosidasami spočívá ve dvojnásobném převrácení anomerní konfigurace. V prvním kroku přijímá kyslíkový atom anomerního centra proton z acidobazického aminokyselinového zbytku, a usnadní tak odstoupení aglykonu. Konfigurace anomerního centra je převrácena a vzniká glykosyl-enzymový intermediát. Ve druhém kroku deprotonovaný acidobazický zbytek působí jako obecná báze a aktivuje molekulu vody, která nukleofilně atakuje intermediát, a tím dochází k druhému převrácení konfigurace na anomerním centru [4]. Mechanismus je znázorněn na Obr. 2A. Invertující glykosidasy katalyzují hydrolyzu jednokrokovým mechanismem, kdy je aglykon přímo vytlačen nukleofilní molekulou vody s jediným převrácením anomerního centra (Obr. 2B) [5].

Zvláštním typem glykosidas jsou β -*N*-acetylhexosaminidasy, u kterých dochází k hydrolyze mechanismem za účasti substrátu. *N*-Acetamidová skupina hraje roli katalytického nukleofilu [6]. U enzymů se nukleofilní zbytek v aktivním centru neúčastní tvorby glykosyl-enzymového intermediátu v prvním kroku katalýzy. Místo toho dochází ke stabilizaci glykosylu za účasti vlastní *N*-acetamidové skupiny substrátu. V prvním kroku mechanismu acidobazický aminokyselinový zbytek kyselí katalyzuje rozštěpení glykosidové vazby. Následuje atak nukleofilním kyslíkem acetamidové skupiny na C-2, což vede k tvorbě bicyklického oxazolinového intermediátu. Po odstoupení aglykonu

acidobazický zbytek s charakterem báze katalyzuje reakci anomerního centra s molekulou vody za vzniku hydrolytického produktu se zachovanou stereochemií [7]. Mechanismus je znázorněn na Obr. 3.



Obrázek 2 A, Mechanismus katalýzy hydrolýzy retenujícími glykosidasami. B, Mechanismus katalýzy hydrolýzy invertujícím glykosidasami [5].



Obrázek 3 Mechanismus substrátově-asistované katalýzy hydrolýzy užívaný β -N-acetylhexosaminidasami [8].

1.1.2. Glykosyltransferasy

Glykosyltransferasy (EC 2.4) jsou enzymy katalyzující vznik glykosidové vazby přenosem sacharidových zbytků - typicky monosacharidu z donorového substrátu na akceptorovou molekulu. Akceptory mohou být sacharidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny či sekundární metabolity jako flavonoidy a antibiotika obsahující nukleofilní hydroxylové skupiny [9, 10]. Donory glykosyltransferas jsou aktivované sacharidy. Podle povahy donoru lze glykosyltransferasy rozlišit na „leloirovské“ a „neleloirovské“.

Donory „leloirovských“ glykosyltransferas jsou cukerné nukleotidy aktivované přítomností příslušného nukleosidu (CMP, UDP, GDP či TDP) připojeného přes mono- nebo di- fosfát. Tyto glykosyltransferasy jsou odpovědné za *in vivo* syntézu většiny glykokonjugátů na povrchu savčích buněk a polysacharidů buněčné stěny rostlin, hub a bakterií [11]. Svůj název dostaly podle objevitele cukerných nukleotidů, lékaře a biochemika L. F. Leloirera roku 1948 [12]. „Neleloirovské“ glykosyltransferasy využívají donory buď aktivované, a to přímou fosforylací sacharidu za vzniku monofosfátu, nebo neaktivované ve formě sacharosy nebo oligosacharidů odvozených od škrobu. Glykosyltransferasy jsou striktně stereoselektivní a regioselektivní.

1.1.3. Ostatní enzymy užívané pro syntézu glykosidové vazby

Transglykosidasy (EC 3.2.1) jsou enzymy formálně řazené mezi glykosidhydrolasy, ale jejich hydrolytická aktivita je velmi nízká. Jsou využívány zejména průmyslově pro glykosylaci pomocí α -D-glukopyranosylu a β -D-furanosylu [13]. Např. α -transglukosidasy (EC 3.2.1.20) je skupina enzymů, které katalyzují hydrolýzu α -glukosylu z neredukujícího konce substrátu nebo přenášejí glukosyl na hydroxylovou skupinu na C-6 za vzniku isomaltooligosaccharidů. α -Transglukosidasy jsou hojně zastoupeny u mikroorganismů, živočichů i rostlin [14].

Glykosidfosforylasy jsou enzymy přenášející sacharidovou jednotku z neredukujícího konce polysacharidu nebo oligosacharidového donoru na anorganický fosfát za vzniku glykosylfosfátu. Vzhledem k nízké rovnovážné konstantě fosforolytické reakce (řádově $K = 10^0$) se jedná o proces reverzibilní. Glykosidfosforylasy jsou také schopné syntetizovat novou glykosidovou vazbu z vhodného glykosidfosfátu a akceptoru, jelikož volná energie glykosidové vazby mezi sacharidy je přibližně stejná jako energie esterové vazby v glykosylfosfátu [15]. Glykosidfosforylasy lze proto zařadit jak mezi glykosidhydrolasy (EC 3.2), tak mezi glykosyltransferasy (EC 2.4) [16].

1.1.4. Mutantní enzymy využívané pro syntézu glykosidové vazby

Glykosynthasy představují velkou skupinu mutantních retenujících glykosidas, které byly připraveny řízenou mutagenezí. Od svého uvedení v roce 1998 [17, 18] způsobily revoluci v enzymové syntéze oligosacharidů. Princip jejich funkce je založen na faktu, že na hydrolýze glykosidové vazby se zásadně podílejí dva katalytické aminokyselinové zbytky, jeden nukleofilní a druhý acidobazický. U glykosynthas je

nukleofil zmutován záměnou za malý hydrofobní aminokyselinový zbytek nenukleofilní povahy. Díky této mutaci nedochází při katalýze k tvorbě glykosyl-enzymového intermediátu, a proto vyžadují tyto enzymy vysoce aktivovaný glykosylový donor s opačnou anomerní konfigurací než má původní substrát; takovým substrátem je například glykosylfluorid [19, 20].

Thioglykoligasy jsou dalšími zástupci mutantních glykosidas vzniklých řízenou mutagenézí. Na rozdíl od glykosynthas je zde vytvořena mutace v acidobazickém aminokyselinovém zbytku. Aby thioglykoligasa plnila funkci syntetického enzymu, musí se v reakci taktéž vyskytovat vysoce aktivovaný donor, kterým je u thioglykoligas taktéž glykosylfluorid ovšem se stejnou anomerní konfigurací jako přirozený substrát. To umožní během reakce rychlou tvorbu komplexu enzym-substrát bez pomoci katalytického acidobazického zbytku [21]. Donorem je silně nukleofilní akceptor, jako např. thioglykosidy [22].

1.2. β -N-Acetylhexosaminidasy

β -N-acetylhexosaminidasy (systematickým názvem 2-acetamido-2-deoxy- β -D-hexopyranosid-acetamidodeoxyhexohydrolasy) jsou enzymy ze skupiny glykosidhydrolas. Jedná se o typické *exo*-glykosidas schopné odštěpovat terminální β -N-acetylglukosamin (GlcNAc) nebo β -N-acetylgalaktosamin (GalNAc) z glykosylovaných struktur [8].

1.2.1. Zařazení β -N-acetylhexosaminidas do systému enzymů

β -N-acetylhexosaminidasy se podle enzymového názvosloví IUB-MB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) řadí mezi:

3.-.-.- Hydrolasy

3.2.-.- Glykosidas

3.2.1.- Glykosidas hydrolyzující O- a S- glykosidové vazby

Přesné zařazení do EC systému je EC 3.2.1.52 [23].

Dalším způsobem klasifikace glykosidas je databáze CAZY (*Carbohydrate-Active enZYmes*). GH rodiny glykosidhydrolas jsou tříděny dle aminokyselinových sekvencí a klanů podle strukturních motivů. CAZY databáze v dnešní době obsahuje 156 rodin a 18

klanů glykosidhydrolas; s rozvíjejícími se znalostmi o strukturách a sekvencích se databáze neustále rozšiřuje. β -*N*-acetylhexosaminidas se v tomto systému řadí do rodin GH3, 20, a 84. Jedinou rodinou je zařazenou do klanu je GH20, a to do klanu K [24].

1.2.2. Struktura a mechanismus β -*N*-acetylhexosaminidas

1.2.2.1. Rodina GH3

Rodina GH3 je malá skupina glykosidas, která využívá klasického mechanismu retenujících glykosidas, jak je popsáno v kap. 1.1.1. Je tvořena β -*N*-glukosaminidasami (EC 3.2.1.52), β -glukosidasami (EC 3.2.1.21) a β -xylosidasami (EC 3.2.1.37). Třídímenzionální (3D) struktura byla popsána u *exo-N*-acetyl- β -glukosaminidas z *Vibrio cholerae* (NagZ), *Bacillus subtilis* (BsNagZ) a *Deinococcus radiodurans* (DrNagZ). U *Vibrio cholerae* byla studována kvůli své roli v bakteriální rezistenci na některá β -laktamová antibiotika [25, 26].

Enzymy rodiny GH3 hrají klíčovou roli při udržování funkcí organismu, při interakci s prostředím včetně interakce mezi hostitelem a patogenem. Podílejí se na biodegradaci a asimilaci řady sacharidů a glykokonjugátů a modifikaci biologické aktivity glykokonjugátů jako například bakteriálních antibiotik [27].

Enzymy jsou tvořeny dvěma doménami. Na N-terminálním konci se vyskytuje struktura $(\alpha/\beta)_8$ TIM-barelu (doména 1). Tato doména je spojena prostřednictvím linkeru s druhou doménou na C-terminálním konci enzymu. Doménu 2 tvoří struktura $(\alpha/\beta)_6$, jedná se o tzv. sendvičovou strukturu složenou z anti-paralelní smyčky [28].

Popis NagZ z grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* s sebou přinesl i zjištění, že roli acidobazického zbytku v aktivním centru hraje histidin, který se nachází v konzervované doméně TIM-barelu. Při studiu inhibice BsNagZ pomocí inhibitoru *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosyliden)amino-*N*-fenyلكarbamátu byla pozorována interakce inhibitoru s imidazolovým cyklem histidinu jakožto acidobazickým zbytkem. Tento objev byl překvapivý, jelikož ve všech rodinách glykosidhydrolas je acidobazickým zbytkem výhradně aminokyselina s karboxylovou skupinou v postranním řetězci [26].

1.2.2.2. Rodina GH20

β -N-Acetylhexosaminidasy rodiny 20 jsou nejvíce zastoupeny a zároveň nejvíce prostudovány. Zástupce lze nalézt jak u eukaryotických, tak u prokaryotických organismů. První bakteriální β -N-acetylhexosaminidou, u které byla popsána krystalová struktura, je chitobiasa ze *Serratia marscescens*. Autorem byl Tews a kol. v roce 1996 [29]. Doposud byla krystalová struktura popsána u řady prokaryotických β -N-acetylhexosaminidas, ale ze zástupců eukaryotních pouze u lidských β -N-acetylhexosaminidas HexA a HexB, které byly izolovány z lidské placenty [30].

Enzymy GH20 jsou strukturně podobné rodině 3 - také obsahují TIM-barel, avšak ne na N-terminálním konci. N-terminální doména je tvořena anti-paralelními β -listy, na které navazují α -helixy, například u *Streptomyces plicatus* se jedná o sedm anti-paralelních β -listů a dva paralelní α -helixy [31]. Aktivní centrum je tvořeno aminokyselinami smyčky na C-terminálním konci řetězce a aminokyseliny β -listů při okraji TIM-barelu. V aktivním centru se vyskytuje vysoce konzervovaný pár aminokyselinových zbytků Asp-Glu [32]. Hydrolýza je katalyzována mechanismem za účasti substrátu podle Obr.3.

1.2.2.3. Rodina GH84

Rodina GH84 je tvořena bakteriálními O-GlcNAcasami a lidskou O-GlcNAcasou (OGA). Právě OGA zapříčinila rostoucí zájem o tuto rodinu. Přesná struktura OGA nebyla dosud odhalena, ale existuje homologní model O-GlcNAcasy, který byl vytvořen na základě 3D struktur dvou bakteriálních O-GlcNAcas. Byly využity známé krystalové struktury O-GlcNAcasy z anaerobního patogenu *Clostridium perfringens* [33], jako druhá byla použita struktura O-GlcNAcasy z *Bacteroides thetaiotamicron*, což je mikrobiální organismus žijící v trávicím traktu člověka [34].

β -N-Acetylhexosaminidasy z GH84 jsou strukturně podobné rodině GH20, tj. katalytická doména tvořena $(\alpha/\beta)_8$ TIM-barelem, s tím rozdílem, že konzervovaný pár aminokyselinových zbytků na C-terminální doméně není tvořen Asp-Glu jako u GH20, nýbrž párem Asp-Asp. V aktivním centru se vyskytuje zbytek tyrosinu. Jeho aromatické jádro stabilizuje oxazolinový intermediát, který vzniká při hydrolýze, jež taktéž probíhá za účasti substrátu (Obr. 3) [35].

1.2.3. Výskyt a funkce β -*N*-acetylhexosaminidas

β -*N*-Acetylhexosaminidas se vyskytují u všech typů živých organismů, výjimkou jsou viry a zástupci říše *Archaea*. Funkce β -*N*-acetylhexosaminidas se u jednotlivých druhů liší a jsou závislé na výskytu a typu organismu.

1.2.3.1. Bakteriální β -*N*-acetylhexosaminidas

Bakteriální β -*N*-acetylhexosaminidas se řadí mezi intracelulární glykosidasy. Většina enzymů je asociována s membránou a účastní se metabolismu muropeptidů, které jsou jedním ze stavebních kamenů buněčné stěny [36].

U gramnegativních bakterií obsahujících NagZ β -*N*-acetylglukosaminidas (GH3) dochází k hydrolýze glykosidové vazby mezi anhydro-*N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetylglukosaminem. Vznikající kyselina 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramová nepřímo indukuje tvorbu β -laktamas, které katalyzují rozštěpení β -laktamového kruhu u antibiotik, a tím vzniká rezistence na β -laktamová antibiotika. Díky těmto poznatkům se část výzkumu bakteriálních β -*N*-acetylhexosaminidas zaměřuje na nalezení selektivního inhibitoru, díky kterému by se dala využít antibiotika i k léčbě nemocí způsobených rezistentními bakteriemi [25].

Zástupcem rodiny GH20 je β -*N*-acetylhexosaminidasa z bakterie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, která kolonizuje dutinu ústní u člověka a způsobuje periodontitidu. Bakterie vytváří biofilm, z něž jsou pomocí β -*N*-glukosaminidas zvané Dispersin B oddělovány buňky z kolonií biofilmu, aby mohly být biofilmem kolonizovány i další povrchy. Dispersin B má unikátní specifitu, jelikož štěpí $\beta(1\rightarrow6)$ vázané *N*-acetylglukosaminové zbytky z lineárního polymeru, kterým je tvořen biofilm [37, 38].

1.2.3.2. Rostlinné β -*N*-acetylhexosaminidas

Přestože byla izolována a charakterizována řada rostlinných β -*N*-acetylhexosaminidas, jejich přesná fyziologická úloha je stále nejasná.

Jednou z možných úloh rostlinných β -*N*-acetylhexosaminidas je účast při zrání plodů. Během vývoje plodů papriky roční (*Capsicum annuum* L.) a rajčete tyčkového (*Lycopersicon esculantum* L.) byl pozorován mírný nárůst aktivity

β -*N*-acetylhexosaminidasy. Výzkum ukázal, že β -*N*-acetylhexosaminidasa není jediným enzymem působícím ve zrajících plodech, nýbrž spolupracuje s α -mannosidasou. Předpokládá se, že vztah těchto dvou enzymů hraje klíčovou roli při zrání plodů [39, 40].

Dále byla β -*N*-acetylhexosaminidasa nalezena v semenech a sazenicích kukuřice seté (*Zea mays* L.), kde byl pozorován nárůst aktivity β -*N*-acetylhexosaminidasy během klíčení. Toto zjištění ukazuje na uplatnění β -*N*-acetylhexosaminidasy při hydrolýze zásobních glykoproteinů, a tím uvolnění *N*-acetylglukosaminu z těchto struktur. Bylo prokázáno, že tyto β -*N*-acetylhexosaminidasy mají vysokou specifitu vůči hydrolýze oligosacharidů s obecným vzorcem (GlcNAc)_{*n*}, kdy hydrolýzou vzniká monosacharid GlcNAc a oligosacharid o jednu podjednotku kratší (GlcNAc)_{*n-1*} [41].

1.2.3.3. Fungální β -*N*-acetylhexosaminidasy

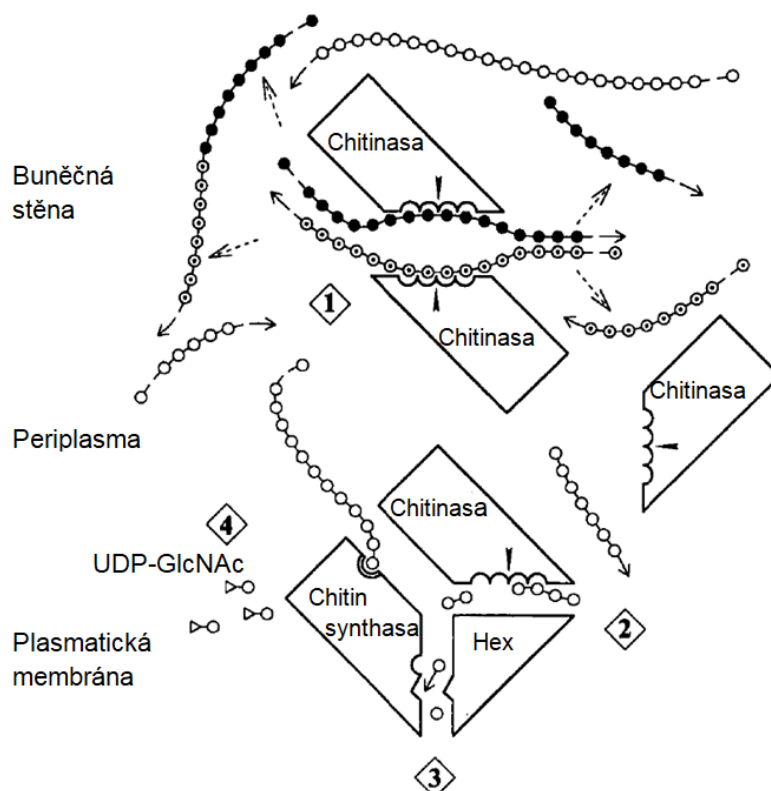
β -*N*-Acetylhexosaminidasa vláknitých hub je součástí skupiny enzymů asociovaných s buněčnou stěnou, kde se spolu s chitinasou (EC 3.2.1.14) a chitinsynthasou (EC 2.4.1.16) účastní metabolismu chitinu [42]. Produkty reakcí katalyzovaných chitinasou a β -*N*-acetylhexosaminidasou jsou významným zdrojem uhlíku a dusíku pro vláknité houby. Chitinsynthasa má opačnou funkci, a to vytváření chitinu. Celý proces zahrnuje reakce hydrolytické a transglykosylační. Tento systém reguluje růst a větvení hyf, tvorbu sept a plodnic [43]. Model metabolismu chitinu je vyobrazen na Obr. 4.

Chytinolytický systém je složen ze čtyř kroků, kde všechny reakce probíhají současně [44]:

- 1) Přestavba chitinového řetězce hydrolýzou stávajícího řetězce a vznik nového řetězce transglykosylací kombinovanou aktivitou chitinasy.
- 2) Hydrolytické štěpení chitinového řetězce hexosaminidasou, vznik stále kratších chitooligomerů.
- 3) Alosterická aktivace chitinsynthasy konečným produktem chitinolýzy, kterým je GlcNAc.
- 4) Syntéza chitinového řetězce *de novo* z UDP-GlcNAc (GlcNAc aktivovaný uridindifosfátem) za katalýzy chitinsynthasou.

Na rozdíl od bakteriálních β -*N*-acetylhexosaminidas, které jsou monomerní a sekretované intracelulárně, jsou houbové hexosaminidasy sekretovány extracelulárně a vyskytují se ve formě dimeru. Savčí hexosaminidasy jsou taktéž dimerní, ale lokalizované v lysozomech. Dimerizace je spolu s *N*-glykosylací nejzásadnější posttranslační modifikací fungálních β -*N*-acetylhexosaminidas. Podjednotky jsou asociovány nekovalentně a reverzibilní dimerizace je závislá na pH, ve kterém se enzym nachází [45].

Fungální β -*N*-acetylhexosaminidasy obsahují velký propeptid, který hraje důležitou roli při aktivaci, dimerizaci a sekreci enzymu. Propeptid je nekovalentně asociován s katalytickými podjednotkami [46]. Pro aktivitu enzymu je vazba alespoň jednoho propeptidu nezbytná, avšak se dvěma propeptidy enzym vykazuje dvakrát vyšší aktivitu. K asociaci katalytické podjednotky s propeptidem dochází před dimerizací enzymu. Buňky jsou schopné regulovat přítomnost propeptidu, a tím i strukturu a aktivitu β -*N*-acetylhexosaminidas podle potřeb buněk během životního cyklu houby [36].



Obrázek 4 Schéma přestavby chitinu chitinolytickým systémem pomocí hydrolytických a transglykosylačních reakcí [44].

1.2.3.4. Živočišné β -*N*-acetylhexosaminidasy

β -*N*-Acetylhexosaminidasy lze nalézt i v říši živočichů, kde plní řadu významných funkcí. U většiny bezobratlých i obratlovců se účastní procesu oplodnění. β -*N*-Acetylhexosaminidasa je přítomna v akrozomální části povrchu spermie, kde napomáhá při prvním kontaktu spermie s obalem vajíčka (zona pellucida), k jejímu navázání na obal a následný vstup do oocyta [47].

U savců je interakce spermie-zona pellucida zprostředkována vazbou glykoproteinu na obalu vajíčka s proteinem spermie, který má charakter lektinu. Této interakci je po oplodnění vajíčka zabráněno, a tím je zabráněno i tzv. polyspermii, čili vstupu dalších spermií do oocyta. Oplodněné vajíčko vylučuje β -*N*-acetylhexosaminidasu, která modifikuje glykoproteiny receptorů určených pro spermie, ty se tudíž nemohou na receptor navázat [48, 49].

1.2.3.5. Lidské β -*N*-acetylhexosaminidasy

Lidské β -*N*-acetylhexosaminidasy jsou dimerní enzymy složené z podjednotek α a β . Aminokyselinová sekvence podjednotek je z 60% identická. Existují dva hlavní lidské isoenzymy lysosomálních β -*N*-acetylhexosaminidas, a to β -*N*-acetylhexosaminidasa A (HexA), což je heterodimer složený z podjednotek α a β , a homodimerní β -*N*-acetylhexosaminidasa B (HexB) složená ze dvou podjednotek β . Podjednotky jsou syntetizované ve formě preproteinů a k jejich úpravě včetně glykosylace odchází v endoplazmatickém retikulu. Pro enzymovou aktivitu je nezbytná asociace podjednotek, která probíhá v Golgiho aparátu [50, 51].

HexB zprostředkovává hydrolýzu neutrálních substrátů, GlcNAc i GalNAc, z neredukujícího konce glykolipidů, glykosaminoglykanů či globosidů. HexA je kromě hydrolýzy neutrálního substrátu schopna štěpit i negativně nabitě substráty, jako jsou 6-sulfatované substráty nebo kyselina sialová. Podjednotka α je nezbytná pro vazbu lipidového transportéru G_{M2} -aktivátoru k HexA. HexA je díky této vazbě schopna štěpit G_{M2} [30, 50].

Nedostatek nebo úplná absence HexA má za následek G_{M2} gangliosidosu, což je obecný název pro rodinu tří autozomálně recesivních poruch, kdy dochází k intralysosomální akumulaci kyselého glykolipidu G_{M2} gangliosidu; primárně k tomu

dochází v mozku a v periferních nervových tkáních. Jedná se o Tay-Sachsovu chorobu, Sandhoffovu chorobu a variantu AB [30].

Existuje ještě β -*N*-acetylhexosaminidasa S (HexS). Jedná se o isoenzym složený ze dvou podjednotek α . Tento isoenzym není považován za fyziologicky významný enzym, jelikož nebyla *in vivo* nalezena žádná jeho funkce [52]. Dále je známa β -*N*-acetylhexosaminidasa D (HexD), která zatím nebyla detailně prozkoumána, ale nedávné studie dávají do souvislosti HexD s onemocněním kloubů známým jako revmatoidní artritida [53, 54].

Dalším zástupcem je lidská cytosolická O-GlcNAcase (OGA), která byla původně označena jako β -*N*-acetylhexosaminidasa C (HexC) [55]. Jako jediná lidská β -*N*-acetylhexosaminidasa se řadí do rodiny GH84 a je výhradně specifická pro GlcNAc. Ostatní lidské β -*N*-acetylhexosaminidasy patří do rodiny GH20. OGA je exprimována ve všech typech savčích buněk a většinou je lokalizována v cytoplazmě. OGA plní opačnou funkci k O-GlcNActransferase (OGT), která zajišťuje glykosylaci serinových a threoninových zbytků intracelulárních proteinů. O-GlcNAcyace úzce souvisí s fosforylací fosfatasami a defosforylací kinasami na serinu a threoninu. Systém O-GlcNAc glykosylace/ fosforylace zprostředkovává signalizaci, expresi a degradaci proteinů [56, 57].

Studie ukázaly, že patologie systému O-GlcNAcyace/ fosforylace proteinu tau má za následek vznik Alzheimerovy choroby. Protein tau, fyziologicky silně glykosylovaný, je při tomto neurodegenerativním onemocnění hyperfosforylován. Řešením tohoto problému by mohly být selektivní inhibitory OGA, čímž by došlo k zamezení odštěpení O-GlcNAc z proteinu a tedy i snížení fosforylace. V konečném důsledku by došlo ke zpomalení nebo dokonce zastavení progresu Alzheimerovy choroby [58].

1.3. *Talaromyces flavus*

Rod *Talaromyces* byl popsán roku 1972. Jedná se o rod vřeckovýtrusých hub produkujících aska v řetízcích. Rod *Talaromyces* je primárně rozdělen podle rozdílů askospor do čtyř sekcí a to *Talaromyces*, *Emersonii*, *Thermophila* a *Purpurea* [59].

Talaromyces flavus (Obr. 5) je vláknitá termorezistentní houba vyskytující se v půdě a odpadu. Je schopná přežít řádově minuty při 90 °C v závislosti na složení

prostředí, ve kterém roste. Další schopností této houby je, že je schopná přežít v mikroaerobním prostředí. Tyto rysy výrazně ovlivňují tepelné zpracování potravin (např. pasterizaci), zejména ovoce, což může představovat riziko pro spotřebitele či nebezpečí hospodářských ztrát v průmyslu [60, 61].

Taxonomické zařazení *Talaromyces flavus* [62]:

Doména: *Eucaryota*
Říše: *Fungi*
Kmen: *Ascomycetes*
Třída: *Eurotiomycetidae*
Řád: *Eurotiales*
Čeleď: *Trichocomaceae*
Rod: *Talaromyces*
Druh: *Talaromyces flavus*



Obrázek 5 *Talaromyces flavus* [61].

1.4. β -N-Acetylhexosaminidasa z *Talaromyces flavus*

Gen β -N-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus* (*TfHex*) obsahuje jednoduchý otevřený čtecí rámec bez intronů sestávající se z 1887 nukleotidů kódujících 628 aminokyselin. *TfHex* vykazuje vysokou homologii s již publikovanými β -N-acetylhexosaminidasami z *Aspergillus oryzae* (*AoHex*) (62 % [36, 46]) a *Penicillium oxalicum* (*PoHex*) (60 % [63]). Celý protein je tetramer a sestává se ze dvou nekovalentně asociovaných podjednotek o velikosti 65 kDa a dvou nekovalentně spojených propeptidů o velikosti 15 kDa; celková velikost nativního enzymu je tedy 160 kDa. Dimer se skládá ze signální sekvence (Met1–Gly17), z propeptidu (Val18–Arg125) a z katalytické podjednotky typické pro glykosidhydrolasy rodiny GH20 (Gly126–Val628) [32]. Celá aminokyselinová sekvence je zobrazena na Obr. 6.

Struktura katalytické podjednotky je stabilizována třemi disulfidovými můstky (Cys315–Cys376; Cys473–Cys510; Cys611–Cys618). Ke stabilizaci slouží také N-glykosylace; ve struktuře *TfHex* se nachází šest potenciálních míst pro N-glykosylaci, a to Asn 170, 343, 378, 433, 453, 527 [64].

Katalytická doména obsahuje malou „zinc-like“ N-koncovou doménu a TIM-barel, v jehož středu se nachází aktivní centrum enzymu. Klíčovými katalytickými zbytky jsou

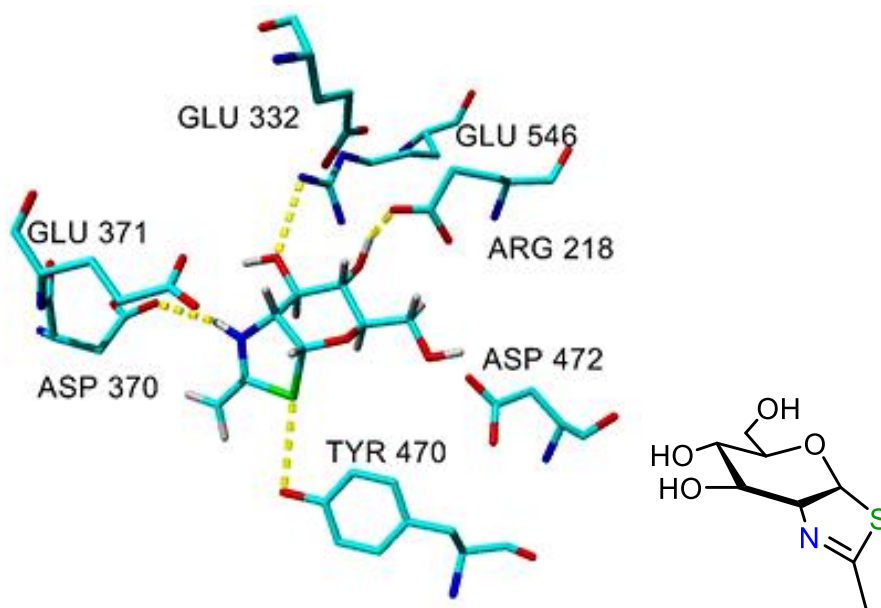
Asp370 (katalytický nukleofil) a Glu371 (katalytická kyselina/ báze). Hydrofobní kapsa aktivního centra je tvořena čtyřmi tryptofanovými zbytky (Trp421, 444, 509 a 544), které pomáhají během interakce se substrátem. Dalšími zbytky aktivního centra jsou Arg218, Glu332, Tyr470, Asp472, Glu546 a Trp509, které tvoří vodíkové vazby se substrátem. Nákres aktivního centra viz Obr. 7. [64].

```

MRVSLVTVSCLASAVAGVAVNPLPAPRSITWGTSGPISVPHNVDVKLPKNAIINDAWERA60
WTSIKQLRWVPQATEAPISSYEPFPTVAPTSASTASSTPLPSSSAAAVAARSQKRGHQKG120
SHEKRGHGSQSTLRTVTVTVSDLNADLQAEVDES YTLVLDSGSSTLAITANTTWGALHAFT180
TLQQLVIYQDNSLIIEQPVHIEDSPLYPWRGVMIDTGR218NFITVPKIKEQIDGMALSKLNI240
LHWHLDDSQSWPVHMDTYPQMTNDAYSPWQTYSHEDIKDIIEYARARAVRVVPEVDMPGH300
SAAGWQQVDPSIVACAHSWWSNDNWPYHTAVE332PTPGQLDPLNNKTYGVVEKVYNELSGIF360
TDDFFHVGGD370E371LQTGCYNFSTYVSDYLAADPSRTYNDVTQYWVDHAFPIFKKIQRKLV420
WEDLIINNPHAPNVSTENLLVQSWNGLTNINNLNLGYDVLVSSSDFMY470LD472CGYGGFVT480
NDPRYDVMVNPDAVDGLANFNWGGNGGSW509CAPYKTWQRIYDYDFTTNLTDAQAAHVKGAV520
APLWS546QVDDTAISGKMWPRAAALAEVLVSGNKDPKTGDKRTTYMTQRILNFREYLVANG580
VQAAPLVPKYCLQHPHSCDLYYDQTAVV628

```

Obrázek 6 Aminokyselinová sekvence *Tj*Hex. **Zeleně** je vyznačena signální sekvence, **červeně** propeptid a **žlutě** aminokyseliny aktivního centra. Převzato a upraveno z [65].



Obrázek 7 Model aktivního centra *Tj*Hex s navázaným GlcNAc thiazolinem, kompetitivním inhibitorem β -N-acetylhexosaminidas odvozeným od oxazolinového intermediátu [66].

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Rekombinantní exprese, purifikace a charakterizace dvou mutantních variant β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus* (TfHex R218K a E546Q) s modifikovanou substrátovou specifitou v *Pichia pastoris*
- Příprava jedné další mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasy s modifikovanou substrátovou specifitou
 - Transformace expresního vektoru
 - Exprese genu v *Pichia pastoris* a screening
 - Produkce mutantního enzymu v *Pichia pastoris* a jeho purifikace
 - Stanovení aktivity a kinetických parametrů, charakterizace enzymu
- Transglykosylační reakce s mutantními enzymy

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Seznam použitých chemikálií

6× *DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, USA)
Aceton (VWR Chemicals, Česká republika)
Acetonitril (VWR Chemicals, Česká republika)
Agar (Sigma-Aldrich, USA)
Akrylamid (VWR Chemicals, Česká republika)
Bakteriologický pepton (Oxoid, Velká Británie)
Biotin (Fkua BioChemika, Švýcarsko)
Bradfordovo činidlo – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
Bromfenolová modř (Serva, Německo)
Chlorid lithný (Lachema, Česká republika)
Chlorid rubidný (Sigma-Aldrich, Česká republika)
Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
Chlorid vápenatý (Lachema, Česká republika)
Coomasie Brilliant blue (USB Corporation, USA)
D-glukosa (Lach-Ner, Česká republika)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
DNA polymerasa: *NZSpeedy DNA Polymerase* (NZYTech, Portugalsko)
DNA polymerasa: *NZProof DNA Polymerase* (NZYTech, Portugalsko)
DpnI (New England Biolabs, Velká Británie)
EDTA (Carl Roth, Německo)
Ethanol (VWR Chemicals, Česká republika)
Escherichia coli Top10 (Thermo Fisher Scientific, USA)
Extrakt z kvasnic (Oxoid, Česká republika)
GelRed (Biotium, USA)
GlcNAc (Acros Organics, USA)
Glycerol dvakrát destilovaný 99,5 % (VWR Chemicals, Česká republika)
Glycin (Lach-Ner, Česká republika)
HEPES (Megazyme, USA)
Hydrogenforforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
Kapalný dusík (Maneko, Česká republika)
Kyselina citronová (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina boritá (Lachema, Česká republika)
Kyselina fenyloctová (Lachema, Česká republika)
Kyselina fosforečná 85 % (Lachema, Česká republika)
Kyselina octová (VWR Chemicals, Česká republika)
Kyselina sírová (VWR Chemicals, Česká republika)
Molekulový marker – *Amersham LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Velká Británie)
3-(*N*-Morfolino)propansulfonová kyselina (MOPS, Sigma-Aldrich, USA)
Hydroxid amonný (Lach-Ner, Česká republika)
Methanol (ISOLAB, Německo)
N,N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
Novozym 435 (Novozymes, Dánsko)
Peroxošíran amonný (USB Corporation, USA)
Pichia pastoris KM71H (Invitrogen, USA)
*p*NP-GalNAc (Gold Biotechnology, USA)
*p*NP-GlcNAc (Gold Biotechnology, USA)
Primery T₇Hex (GENERI BIOTECH s.r.o., Česká republika)
Propan-2-ol (VWR Chemicals, Česká republika)
Pyridin (VWR Chemicals, Česká republika)
SacI (New England Biolabs, Velká Británie)
SDS (Serva, Německo)
Síran amonný (Lach-Ner, Česká republika)
Síran hořečnatý (Lachema, Česká republika)
Síran zinečnatý (Lachema, Česká republika)
Sorbitol (Lach-Ner, Česká republika)
Syntetické plasmidy pPICZαA (Generay Biotech Co., Ltd, Čína)
TEMED (Sigma-Aldrich, USA)
Terc-butanol (VWR Chemicals, Česká republika)
Toluen (VWR Chemicals, Česká republika)

Tris-Cl (Sigma-Aldrich, USA)
Trypton (Oxoid, Česká republika)
Uhličitan sodný (Lachema, Česká republika)
YNB (*yeast nitrogen base*; Carl-Roth, Německo)
Vinylacetát (Alfa Aesar, USA)

3.2. Seznam roztoků a médií

LB (Luria-Bertani) médium (100 ml)

1 g trypton, 0,5 g kvasničný extrakt, 1 g NaCl

LBA médium

1 g trypton, 0,5 g kvasničný extrakt, 1 g NaCl, 2 g agarosa

YP médium (100 ml)

1 g kvasnicový extrakt, 2 g pepton

YPA médium (100 ml)

1 g kvasnicový extrakt, 2 g pepton, 2 g agarosa

YPD médium (100 ml)

1 g kvasnicový extrakt, 2 g pepton, 10 ml 20% D-glukosa

YPDSA médium (100 ml)

1 g kvasnicový extrakt; 2 g pepton; 10 ml 20% D-glukosa; 18,2 g sorbitol

Minimální glycerolové médium (1 l)

700 ml H₂O; 100 ml 10% glycerol; 100 ml 1M draselno-fosfátový pufr; 100 ml YNB;
2 ml 0,02% biotin

Minimální methanolové médium (200 ml)

140 ml H₂O; 20 ml 1M draselno-fosfátový pufr pH 6, 20 ml YNB, 20 ml 5% methanol,
400 µl 0,02% biotin

Plné glycerolové médium (1 l)

700 ml H₂O; 100 ml 10% glycerol; 100 ml 1M draselno-fosfátový pufr pH 6; 100 ml YNB; 2 ml 0,02% biotin

Plné methanолоvé médium (200 ml)

140 ml H₂O; 20 ml 1M draselno-fosfátový pufr pH 6; 20 ml YNB; 20 ml 5% methanol;
400 µl 0,02% biotin

Draselno-fosfátový pufr pH 6,0

1M K₂HPO₄; 1M KH₂PO₄

McIlvaine pufr (50 mM citrát-fosfátový pufr) pH 5

50mM kyselina citronová; 100mM Na₂HPO₄

Pufr A: 10 mM citrát-fosfátový pufr pH 3,5

10mM kyselina citronová; 20mM Na₂HPO₄

Pufr B: 10 mM citrát-fosfátový pufr; 1M NaCl pH 3,5

10mM kyselina citronová; 20mM Na₂HPO₄; 1M NaCl

Separční 10% polyakrylamidový gel (10 ml)

4,0 ml H₂O; 3,3 ml 30% akrylamidový mix (29% akrylamid, 1% *N,N'*-methylenbisakrylamid); 2,5 ml 1,5M Tris-Cl pH 8,8; 100 µl 10% SDS; 100 µl 10% peroxosíran amonný; 4 µl TEMED

Zaostřovací gel (5 ml)

3,4 ml H₂O; 830 µl 30% akrylamidový mix (29% akrylamid, 1% *N,N'*-methylenbisakrylamid); 630 µl 1,0M Tris-Cl pH 6,8; 50 µl 10% SDS; 50 µl 10% peroxosíran amonný; 5 µl TEMED

5× vzorkový pufr (5 ml)

0,151 g Tris; 0,3855 g DTT; 0,5 g SDS; 0,025 g bromfenolová modř; 1,25 ml glycerol

5× elektrodoový pufr (1 l)

5 g SDS; 15 g Tris; 94 g glycin

Barvicí roztok (100 ml)

0,25 g *Coomasie Brilliant Blue* R250; 45 ml methanol; 45 ml H₂O; 10 ml 99% kyselina octová

Odbarvovací roztok (1 l)

350 ml ethanol; 100 ml kyselina octová; 550 ml H₂O

1% agarosový gel (100 ml)

1 g agarosa; 2 ml 50× TAE pufr; 98 ml H₂O

50× TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr (1 l)

242 g Tris; 57,1 ml kyselina octová; 14,6 EDTA

Britton-Robinsonův pufr rozsah pH 2-12

Roztok A: 0,04 M kyselina fosforečná, 0,04 M kyselina fenyloctová, 0,04 M kyselina boritá

Roztok B: 0,2 M hydroxid sodný

Např. pH 7: A/ B = 10/ 5,2

TFB I (Transformační pufr), (150 ml)

4,5 ml 1M octan draselný; 1,8 g RbCl; 1,48 g MnCl₂·4 H₂O; 0,221 g CaCl₂·2 H₂O;
22,5 ml glycerol

TFB II (100 ml)

2 ml 0,5M MOPS; 0,12 g RbCl; 1,19 g CaCl₂·2 H₂O; 15 ml glycerol

Vyvíjecí fáze na TLC (500 ml)

350 ml propan-2-ol; 100 ml H₂O; 50 ml NH₄OH

3.3. Seznam komerčních setů

High Pure Plasmid Isolation Mini Kit (Roche, Švýcarsko)

High Pure Plasmid Isolation Midi Kit (Roche, Švýcarsko)

JETquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed, USA)

3.4. Přístrojové vybavení

Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences, Velká Británie)

Aparatura na agarosovou elektroforézu (Bio-Rad, USA)

Aparatura na SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)

Centrifugy: Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, USA)

Universal 320 R (Hettich, Německo)

Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA)

Sorvall Centrifuge RC 6+ (Thermo Scientific, USA)

Fotoaparát na gely: MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging systems, Izrael)

Elektroporátor: MicroPulser Electroporator (Bio-Rad, USA)
HPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko)
Chromatografické kolony: Bio-Gel P2, 45 $\mu\text{m} \times 1000 \text{ mm} \times 26 \text{ mm}$ (Bio-Rad, USA)
Fractogel EMD SO^{3-} (Merck, Německo)
TSKgel Amide-80 HPLC Column 5 $\mu\text{m} \times 250 \text{ mm} \times 46 \text{ mm}$
(Tosoh Bioscience, Japonsko)
Kyvety na elektroporaci (Bio-Rad, USA)
Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)
Lyofilizátor Lyovac GT2 (Leybold GmbH, Německo)
Magnetická míchačka AREX, VELS SCIENTIFICA
PCR termocykler: Termocykler TPersonal 20 (Biometra, Německo)
pH metr: pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Česká republika)
Rotační vakuová odparka: Laborota 4001 (Heidolph, Německo)
Sběrač frakcí pro gelovou chromatografii: Pump P-1 (Pharmacia Biotech, USA)
Spektrofotometr: Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko)
Termomixér: Thermomixer comfort (Eppendorf, USA)
Třepačky IKA KS 4000 ic control (Schoeller, Česká republika)
UV lampa, UV 240 (A. Krüss Optronics, Německo)
UV pultík (UVitec, Velká Británie)
UV/VIS spektrofotometr: UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)
Váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

3.5. Metody

3.5.1. Polymerasová řetězová reakce (PCR) s mutantními primery

Metoda užívaná k řízenému zavedení bodové mutace do DNA, poprvé publikovaná v roce 1999 W. Wangem a kol. [67].

PCR probíhá ve třech krocích. Prvním krokem je denaturace DNA, kdy vlivem vysoké teploty, obvykle 94 – 98 °C, dochází k rozrušení vodíkových můstků a rozvolnění dvouvláknové DNA. Vzniká jednovláknová DNA, na kterou v druhém kroku nasedají primery na specifická místa při teplotě 50 – 65 °C. Ve třetím kroku se na úseky DNA-

primer váže DNA polymerasa a dochází k samotné syntéze komplementárního vlákna od 5'-konce ke 3'-konci.

Metoda byla použita pro přípravu nové mutantní β -N-acetylhexosaminidasy *TfHex* E546H. Jako templát byl použit plazmid *TfHex*E546Q, kde bylo naším cílem zaměnit triplet CAG za CAT. Byly navrženy dva oligonukleotidové primery s vnesenou mutací a komerčně syntetizovány (Generi Biotech):

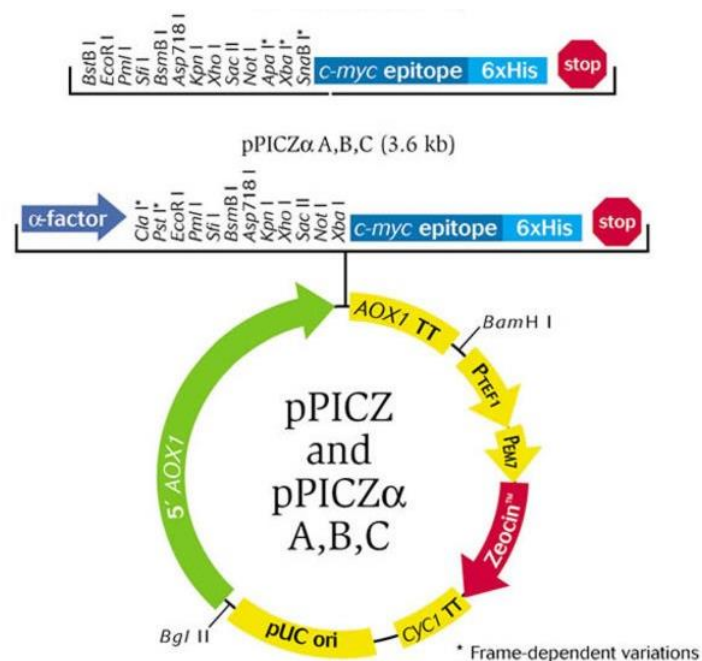
*TfHex*E546H_Fw: 5'-GCG CCG TTG TGG TCT **CAT** CAG GTC GAC GAT-3'
*TfHex*E546H_Re: 5'-ATC GTC GAC CTG **ATG** AGA CCA CAA CGG CGC-3'

Byl použit expresní vektor pPICZ α A (Obr. 8) s vnesenou rezistencí na zeocin (selekční marker), počátkem replikace pro *Escherichia coli* (pUC ori), restrikčními místy 5'*Eco*RI a 3' *Kpn*I a indukibilním alkoholoxidasovým promotorem (AOX1) pro expresi v *Pichia pastoris*.

Po ukončení PCR bylo do reakční směsi připipetováno 1 μ l restrikční endonukleasy *Dpn*I, která štěpí methylovanou templátovou DNA, ale nikoliv PCR produkt. Směs byla přes noc inkubována v termomixéru při 37 °C a 300 ot./min. Poté byla restrikční endonukleasa inaktivovaná při 80 °C po dobu 20 minut.

Do reakční směsi bylo připipetovány dvě barvy: 6 μ l 6 \times *DNA Loading Dye* a 1 μ l 20 \times *GelRed*. Jako referenční vzorek bylo použito 0,5 μ l plazmidu *TfHex* E546Q s 4,5 μ l sterilní vody, 1 μ l 6 \times *DNA Loading Dye* a 0,5 μ l 20 \times *GelRed*. Vzorky byly separovány v 1% agarosovém gelu, jako separační roztok byl použit 1 \times TAE pufr.

Pozitivní proužek velikostně odpovídající nativnímu *TfHex* templátu byl vyříznut a plazmid byl izolován pomocí komerčního kitu *JETquick Gel Extraction Spin Kit*, kdy byl gel rozpouštěn v roztoku L1 („*Gel Solubilization Buffer*“) při 50 °C po dobu 15 minut. Vzniklý roztok byl nanesen na kolonku a centrifugován 1 minutu při 13 500 ot./min. Dále byla kolonka promyta 500 μ l roztoku L2 („*Wash Buffer*“) a centrifugována stejným způsobem, poté byla znovu provedena centrifugace kolonky, tentokrát naprázdno. Kolonka byla vložena do sterilní mikrozkušavky a plasmid byl eluován 30 μ l sterilní vody předeřáté na 65 °C pro lepší eluci plasmidu a vyšší výtěžek.



Obrázek 8 Mapa vektoru pPICZ A pro *P. pastoris* [68].

3.5.2. Transformace plazmidu do *Escherichia coli*

E. coli je v dnešní době nejpoužívanějším modelovým organismem v genetice a mikrobiologii. Nejčastěji používá k expresi proteinů. Překážkou v produkci rekombinantní TjHex je, že se jedná o eukaryotní enzym a *E. coli* není schopná vytvářet posttranslační modifikace proteinů. Proto byla použita pouze pro namnožení DNA.

3.5.2.1. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* Top10

Nejprve byla připravena noční kultura, kdy je 100 µl zásobní kultury odebráno do 10 ml LB media a inkubováno do druhého dne při 37 °C a 220 ot./min.

Druhý den bylo z noční kultury odebráno 1,5 ml, bylo zaočkováno 100 ml LB media a inkubováno při 37 °C a 220 ot./min. V průběhu inkubace byla měřena optická hustota při 600 nm proti vodě. Při dosažení absorbance 0,8-0,9 byla kultura přelita do sterilních vychlazených polyethylenových (PE) zkumavek o objemu 50 ml a centrifugována 15 minut při 4 °C a 4500 ot./min. Pelet byl resuspendován v 15 ml transformačního pufru TFB I. a inkubován 20 minut na ledu. Následně byla kultura za stejných podmínek stočena a pelet resuspendován ve 4 ml TFB II. Takto připravené buňky byly rozpipetovány do předchlazených mikrozkušavek po 100 µl a uloženy do mrazáku na -80 °C.

Z noční kultury byla připravena nová zásobní kultura přidavkem 4,5 ml sterilního glycerolu, rozpipetováním po 500 µl a zamrazením na –80 °C.

3.5.2.2. Postup transformace a množení kolonií

Nejprve bylo rozehráto 100 ml sterilního LBA media, po zchladnutí bylo přidáno 100 µl antibiotika zeocin (100 µg/ml) a rozděleno do čtyř Petriho misek.

Kryokonzervované kompetentní buňky *E. coli* Top10 (100 µl) byly 20 minut rozmrazovány na ledu, následně bylo připipetováno 0,5 µl syntetického plasmidu (200 ng), popř. 10 µl produktu PCR. Transformace plazmidu byla provedena tepelným šokem při 42 °C po dobu 75 sekund v termomixéru. Poté byly bakterie regenerovány přidavkem 1 ml LB media po dobu minimálně 1 hodiny při 37 °C a 350 ot./min. Buňky byly následně stočeny 10 minut při 14 500 ot./min a 12 °C, 800 µl supernatantu bylo odpipetováno a se zbylým byl resuspendován pelet. Bakterie o různém množství byly naočkovány na misky a rozetřeny hokejkou do zaschnutí. Petriho misky byly v termostatu inkubovány při 37 °C do druhého dne.

3.5.2.3. Izolace plazmidu v analytickém množství

Používá se k izolaci DNA z *E. coli*, které byly transformovány produktem PCR. Koncentrace plazmidu, čistota i účinnost transformace je poměrně nízká, a tak tato metoda slouží hlavně k výběru kolonií s vneseným zmutovaným plasmidem. Z těchto důvodů se obvykle provádí screening alespoň šestnácti kolonií.

Nejprve byly 3 ml LB media se zeocinem (100 µg/ml) v 50ml PE zkumavce zaočkovány jednou izolovanou kolonií z naočkované misky. Tyto kultury byly kultivovány při 37 °C a 250 ot./min a druhého dne byly zpracovány pomocí komerčního kitu „*High Pure Isolation Kit*“.

Kultury se v PE zkumavkách centrifugovaly 10 minut při 4500 ot./min a 12 °C. Pelet byl resuspendován v 250 µl pufru „*Suspension Buffer*“ a přepipetován do sterilní mikrozkušavky, následně bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru („*Lysis Buffer*“) a inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 350 µl vychlazeného pufru pro navázání („*Binding Buffer*“) a inkubováno 5 minut na ledu. Po inkubaci byla směs stočena 10 minut při 13 500 ot./min a 12 °C. Supernatant byl převeden na kolonku a

stočen 1 minutu při 10 000 ot./min. Poté byla kolona promyta 500 µl promývacího pufru I. a 700 µl promývacího pufru II. („*Wash Buffer*“); po každém promytí následovala centrifugace (1 min, 10 000 ot./min). Následně byla provedena centrifugace naprázdno (2 min, 13 500 ot./min). Kolonka byla umístěna do sterilní mikrozkušavky, na kolonku bylo pipetováno 30 µl sterilní vody a centrifugováno 1 minut na 10 000 ot./min, proteklá voda byla vrácena na kolonku a znovu centrifugována.

Čistota vymytého plazmidu byla ověřena elektroforézou v 1% agarosovém gelu. 5 µl plazmidu bylo smíšeno s barvami 6× *DNA Loading Dye* (1 µl) a 20× *GelRed* (0,5 µl). Jako referenční vzorek bylo použito 0,5 µl plazmidu *TfHex E546Q* s 4,5 µl sterilní vody a stejný množství barev. Jako separační roztok byl použit 1×TAE pufr. Vzorky, které obsahovaly produkt odpovídající retencí referenčnímu vzorku, byly sekvenovány Sangerovou metodou (zprostředkovala firma SEQme s.r.o.).

Sekvenační primery: Re_5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Fw_5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

3.5.2.4. Izolace plazmidu v preparativním množství

Užívá se pro izolaci DNA z *E. coli* transformované syntetickým plazmidem či produktem PCR, u kterého bylo sekvenací ověřena přítomnost mutace.

100 ml LB media se zeocinem (100 µg/ml) v 1l Erlenmayerově baňce bylo zaočkováno izolovanou kolonií z misky. Tato kultura byla kultivována 24 hodin při 27 °C a 250 ot./min. Následující den byly kultury zpracovány pomocí komerčního setu „*High Pure Isolation Midi Kit*“ jehož součástí jsou pufry, kolonky sloužící k zachycení DNA a skládaný filtr.

Narostlá kultura se centrifugovala 20 minut při 5000 ot./min a 8 °C, pelet byl resuspendován 8 ml pufru („*Suspension Buffer*“), po promíchání byl přidáno 8 ml lyzačního pufru („*Lysis Buffer*“) promícháno a inkubováno 2 minuty na ledu. Po přidání 8 ml neutralizačního pufru („*Neutralisation Buffer*“) k suspenzi a inkubaci 5 minut na ledu se vytvořily bílé vločky. Kolonka byla umístěna do stojanu a promyta 2,5 ml pufru („*Equilibration Buffer*“). Následně byl lyzát zfiltrován přes skládaný filtr umístěný v nálevce a nechal se vykat na kolonku. Po protečení byly do kolony přidány 2×4 ml promývacího pufru („*Wash Buffer*“) a eluát se nechal vykat do odpadní PE zkumavky.

Následovalo eluování plazmidu pufrem („*Elution Buffer*“) předeřátým na 50 °C; plazmid byl jímán do sterilní PE zkumavky. K roztoku bylo přidáno 3,6 ml propan-2-olu a inkubováno při 4 °C do druhého dne. Roztok s vysráženou DNA byl postupně pipetován do 1,5ml mikrozkuavky a centrifugován 30 minut při 4 °C a 15 000 ot./min. Supernatant byl odpipetován a pelet s DNA rozpuštěn ve sterilním 70% ethanolu. Roztok byl promíchán a znovu centrifugován 10 minut při 18 000 ot./min a 4 °C. Ethanol byl odpipetován a peleta se nechala vysušit. Suchá peleta byla následně rozpuštěna ve 100 µl sterilní vody.

Z roztoku byla stanovena koncentrace DNA spektrofotometricky při 260 nm a koncentrace proteinů spektrofotometricky při 280 nm. Čistota byla ověřena dvěma způsoby, pomocí 1% agarosového gelu a výpočtem podle vzorce:

$$\text{čistota} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

U čisté DNA je poměr roven přibližně 1,8 u čisté RNA je okolo 2. Výrazně nižší hodnota značí, že je roztok kontaminován proteiny.

3.5.3. Expres mutantních β -N-acetylhexosaminidas v *P. pastoris*

3.5.3.1. Příprava kompetentních buněk *P. pastoris*

První den bylo zaočkováno 50 µl kryokonzervované kultury *P. pastoris* KM71H do 50 ml YPD media a inkubováno při 28 °C a 160 ot./min. Po 24 hodinách bylo 150 µl této prekultury zaočkováno do 500 ml YPD media a inkubováno stejným způsobem přibližně 16 hodin. Třetího dne byl průběh kultivace sledován pomocí stanovení optické hustoty spektrofotometricky při 600 nm. Při dosažení absorbance 1,1–1,2 byla kultura centrifugována ve dvou sterilních kyvetách 5 minut při 4 °C a 3000 ot./min. Buňky v každé kyvetě byly resuspendovány s 50 ml YPD a 10 ml 1M HEPES o pH 8,0, následně bylo přidáno 1,25 ml DTT, promícháno a inkubováno 15 minut při 30 °C. Pak bylo do každé kyvety přidáno 200 ml namraženého 1M sorbitolu a centrifugováno 5 minut při 4 °C a 3000 ot./min. Pelety byly resuspendovány v 50 ml namraženého 1M sorbitolu a doplněny na objem 250 ml. Suspenze byla za stejných podmínek zcentrifugována a pelet se resuspendoval v 10 ml namraženého 1M sorbitolu. Kvasinky byly spojeny do jedné 50ml PE zkumavky a centrifugovány. Posledním krokem přípravy bylo resuspendování peletu v 0,5 ml namraženého 1M sorbitolu.

3.5.3.2. Příprava plazmidu a transformace do *P. pastoris*

Transformace do *P. pastoris* byla provedena fyzikální metodou zvanou elektroporace, která se provádí ve speciálních kyvetách potažených hliníkovými plíškami. Na buňky v kyvetách působí krátké elektrické pulsy v řádově μs - ms o vysokém napětí. Působením elektrického pole dochází ke zvýšení permeability plazmatické membrány buněk a k reverzibilnímu otevření iontových kanálů, kterými do buněk snáze vstoupí DNA. K uzavírání iontových kanálů a obnovení permeability membrány dochází samovolně po přerušení elektrického pole.

Aby mohl být plazmid transformován do *P. pastoris*, je nutné ho linearizovat. Plazmid byl štěpen pomocí restriční endonukleasy *SacI* v NEB pufru č. 1 (součást komerčního kitu). Do reakční směsi bylo pipetováno 30 μg plazmidu, 3 μl endonukleasy, 3 μl NEB pufru a objem byl doplněn sterilní vodou na 30 μl . Směs byla inkubována při 37 °C a 300 ot./min přes noc. Druhý den byla linearizovaná DNA separována na 1% agarosovém gelu a izolována pomocí komerčního setu *JETquick Gel Extraction Spin Kit*.

K 60 μl kompetentních buněk *P. pastoris* bylo připipetováno 20 μl linearizovaného plazmidu a inkubováno 5 minut. Vzorek byl poté přenesen do elektroporační kyvety a elektroporován. Po elektroporaci byl ke vzorku přidán 1 ml 1M namraženého sorbitolu a inkubován alespoň 1 hodinu při 28 °C.

100 ml tuhého YPDSA media bylo rozehráto, po ochladnutí byl přidán zeocin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a médium rozděleno do čtyř Petriho misek. Kvasinky o různých koncentracích byly nanášeny na misky a dosucha rozetřeny hokejkou. Kolonie rostly 3 dny při 28 °C.

3.5.3.3. Analýza produkce β -N-acetylhexosaminidas v koloniích *P. pastoris*

Z kolonií kvasinek narostlých na miskách s agarosovým médiem bylo náhodně vybráno šestnáct kolonií a zaočkováno do 100 ml plného glycerolového média v 11 Erlenmayerových baňkách. Kultury byly kultivovány 28 hodin při 28 °C a 220 ot./min. Druhého dne byly stočeny 20 minut při 8 °C a 5000 ot./min ve sterilních 50ml PE zkumavkách. Pelety byly sterilně resuspendovány ve 20 ml plného methanolového média v 300ml Erlenmayerových baňkách, čímž byla indukována produkce enzymu. Třetího a čtvrtého dne byla produkce dále indukována přídatkem 150 μl methanolu.

Pátého dne byla vyhodnocena produkce proteinu pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a enzymová aktivita proteinu exprimovaného mutantním genem. 1 ml každé kultury byl stočen 15 minut při 15 000 ot./min a 4 °C a supernatant byl zakoncentrován 0,5ml ultracentrifugačním filtrem (centrifugováno za stejných podmínek) na 50 μ l. 10 μ l zakoncentrovaného supernatantu bylo použito na SDS-PAGE.

3.5.3.4. Kryokonzervace *P. pastoris*

Vybrané kolonie byly pomocí jednorázové kličky natřeny na Petriho misku s YPDA médiem s přídavkem zeocinu (100 μ g/ml) a inkubovány při 28 °C. Narostlé kolonie byly pomocí sterilního párátko převedeny do 100 ml YPD media v 1l Erlenmayerově baňce a inkubovány při 28 °C a 220 ot./min. Druhého dne by kultura stočena 10 minut při 12 °C a 5000 ot./min a pelet byl resuspendován 5 ml YPD media a 750 μ l glycerolu. Buňky byly následně rozpipetovány po 100 μ l do sterilních mikrozkušavek a uchovány při –80 °C.

3.5.4. Produkce mutantních β -N-acetylhexosaminidas v *P. pastoris*

3.5.4.1. Exprese β -N-acetylhexosaminidas v *P. pastoris*

K produkci β -N-acetylhexosaminidas v preparativním měřítku byly použity kryokonzervované kultury *Pichia pastoris* KM71H nesoucí gen příslušného enzymu. Nejprve byla vytvořena prekultura zaočkováním kultury do 15 ml YPD media. Prekultura byla kultivována alespoň 4 hodiny při 28 °C a 220 ot./min. Následně byl prekulturou zaočkován 1 l sterilního minimálního glycerolového media (složení viz kap. 3.2) v 3l Erlenmayerově baňce a kultivován do druhého dne 28 °C a 220 otáčkách/min.

Druhý den byla buněčná kultura stočena 20 minut při 5000 ot./min a 8 °C. Pelet byl sterilně resuspendován ve 200 ml sterilního minimálního methanolového media (složení viz kap. 3.2) v 1l Erlenmayerově baňce a kultivován při 28 °C a 220 ot./min. Produkce enzymu byla třetího a čtvrtého dne indukována 1 ml methanolu tak, aby jeho koncentrace byla 0,5% (v/v). Indukce methanolem se provádí, protože *P. pastoris* je methanolotrofní kvasinka, která využívá methanol jako zdroj uhlíku.

3.5.4.2. Zpracování narostlých kultur a purifikace β -N-acetylhexosaminidas

P. pastoris je organismus produkující enzymy extracelulárně. Pátého dne byly proto narostlé kvasinky stočeny 20 minut při 5000 ot./min a 8 °C a supernatant obsahující β -N-acetylhexosaminidasu byl zředěn destilovanou vodou asi 1:3. pH supernatantu bylo upraveno roztokem kyseliny citronové na pH 3,5 a zfiltrován přes trojitý papírový filtr na Büchnerově nálevce.

Takto připravený hrubý rekombinantní enzym by purifikován pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Fractogel SO³⁻ (silný katex) na nízkotlaké chromatografické sestavě Äkta Prime Plus. Kolona byla nejprve promývána 150 ml ultračisté vody, 150 ml pufru B (složení pufrů viz kap. 3.2) a 150 ml pufru A při průtoku 15 ml/min. Roztoky užívané se systémem Äkta Prime Plus bylo nutné nejprve zfiltrovat přes fritu, aby nedošlo k zanesení pump či detektoru částicemi nečistot. Poté byl nanesen roztok enzymu průtokem 15 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 150 ml pufru A pro vymytí nespecificky navázaných proteinů. Následně byl enzym eluován gradientem soli obsažené v pufru B o délce 60 ml (2 ml/min, 0-1M NaCl). Průběh purifikace byl sledován pomocí UV detektoru, kdy byla měřena absorbance při 220 nm. Enzym byl jímán do sterilní 50ml PE zkumavky. Po ukončení eluce byla kolona promyta 150 ml roztoků v následujícím pořadí: 1 M NaOH, ultračistá voda, 1 M NaCl, ultračistá voda, 20% ethanol.

Purifikovaný enzym byl následně zakoncentrován 15ml centrifugačním filtrem a přepufrován do McIlvainova pufru pH 5,0. Optimální koncentrace proteinu pro skladování byla 10-50 mg/ml; při vyšších koncentracích by mohlo dojít k precipitaci proteinu. Enzym byl sterilně zfiltrován a uchováván při 4 °C několik měsíců.

3.5.5. Charakterizace mutantních β -N-acetylhexosaminidas

3.5.5.1. Stanovení čistoty a koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena Bradfordovou metodou, která je založená na interakci proteinů s barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 v kyselém prostředí. Při navázání barviva na protein se barva roztoku mění z hnědé na modrou - toto zbarvení se měří spektrofotometricky při 595 nm. Změna barvy je způsobená především bazickými aminokyselinami v řetězci, jako je lysin, arginin a histidin. Množství navázaného barviva je zhruba přímo úměrné množství pozitivních nábojů v molekule proteinu [69].

Koncentrace proteinů v neznámém vzorku se odhaduje na základě porovnání s kalibrační křivkou naměřenou za stejných podmínek. V této práci byla používána kalibrace s hovězím γ -globulinem.

Do reakční směsi bylo pipetováno 100 μ l vhodně zředěného roztoku enzymu a 1 ml Bradfordova činidla. Reakce byla promíchána a ponechána při laboratorní teplotě 15 minut. Následně byla změřena absorbance při 595 nm.

Čistota proteinů byla stanovena pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Nejprve byl připraven 10% separační gel, nanesen do skleněné aparatury Bio-Rad přibližně 1,5 cm od vrchního okraje a převrstven 1 ml *n*-butanolu. *n*-Butanol zabrání vyschnutí gelu, jelikož proces tuhnutí byl urychlen teplotou 40 °C. Po odsátí butanolu filtračním papírem byl na separační gel nanesen gel zaostřovací po okraj aparatury, do něj byl vsunut hřebínek, a gel byl ponechán při laboratorní teplotě do ztuhnutí.

Vzorek obsahující 20–40 μ g proteinu byl smísen s 5 \times koncentrovaným vzorkovým pufrem obsahujícím denaturační činidla SDS a DTT. SDS kromě denaturace proteinů obalí protein a udělí mu negativní náboj, DTT způsobí redukci disulfidových můstků. Posledním krokem přípravy vzorku bylo zahřátí na 99 °C po dobu 5 minut v termomixéru. Vzorek byl pomocí automatické pipety nanesen do jamek SDS gelu, který byl umístěn do separační vany s elektrodoým pufrem. Do první jamky byl vždy nanesen nízkomolekulární marker LMW. Vana byla uzavřena a připojena ke zdroji proudu s nastaveným napětím 130 V. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury, obarven barvicím roztokem obsahujícím Coomassie Brilliant Blue a následně bylo pozadí proužků odbarveno odbarvovacím roztokem a gel byl uchován v 1% kyselině octové při 4 °C.

3.5.5.2. Stanovení aktivity β -*N*-acetylhexosaminidas

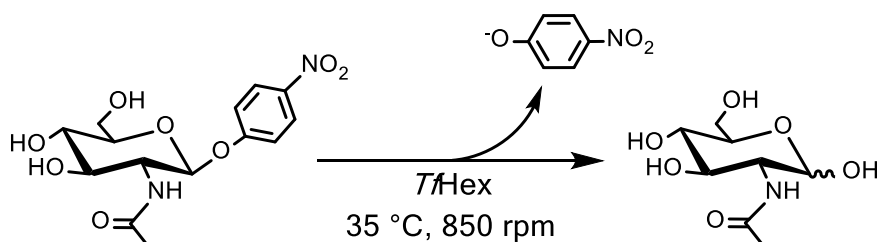
Stanovení hydrolytické aktivity β -*N*-acetylhexosaminidas bylo prováděno spektrofotometricky. Ke stanovení byly použity substráty *p*NP-GlcNAc a *p*NP-GalNAc. Reakční směs v mikrozkušavkách obsahující substrát *p*NP-GlcNAc nebo *p*NP-GalNAc o koncentraci 2 mM a McIlvainův pufr pH 5,0 byla vytemperována v termomixéru na 35 °C, reakce byla zahájena přidávkem 10 μ l enzymu. Reakce probíhala 10 minut při

850 ot./min a byla ukončena přidavkem 1 ml 0,1M uhličitanu sodného. Uvolněný *p*-nitrofenol odštěpený z příslušného substrátu se v bazickém prostředí vyskytuje ve formě *p*-nitrofenolátového aniontu, který má žluté zbarvení a je možné změřit jeho absorbanci při 420 nm (schéma reakce na Obr. 9). Měření bylo prováděno alespoň ve třech paralelních stanoveních proti referenčnímu vzorku, který obsahoval pouze substrát a pufr.

Z průměrných hodnot absorbancí byla vypočítána aktivita podle vzorce:

$$AKT = \frac{\overline{ABS} \cdot V_c \cdot \text{\textit{řed}}}{K \cdot V_e \cdot t}$$

kde **AKT** je aktivita enzymu v jednotkách U/ml, \overline{ABS} značí průměr absorbancí, V_c celkový objem reakční směsi (50 μ l), **\textit{řed}** ředění enzymu použitého ke stanovení, **K** konstanta z kalibrační přímky závislosti absorbance *p*-nitrofenolu na jeho koncentraci (0,7196 mM⁻¹), V_e objem enzymu (10 μ l) a *t* reakční čas v minutách.



Obrázek 9 Schéma reakce používané ke stanovení hydrolytické aktivity se substrátem *p*NP-GlcNAc (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

pH optimum β -*N*-acetylhexosaminidasy bylo stanoveno v prostředí univerzálního Britton-Robinsonova pufru (složení viz kapitola 3.2), který se používá v rozmezí hodnot pH od 2 do 12. Pufr byl použit v reakční směsi i k ředění enzymu. Aktivita byla stanovena při teplotě 35 °C. Byla provedena tři paralelní měření, z nichž byla vyhodnocena průměrná hodnota, směrodatná odchylka a vypracován graf závislosti specifické aktivity enzymu na pH. Z grafu byla stanovena optimální hodnota pH.

Teplotní optimum bylo stanoveno v McIlvainově pufru pH 5. Stanovení bylo prováděno od teploty 20 °C, poté byla teplota reakční směsi zvyšována o 5 °C až do teploty, kdy byl enzym zcela inaktivován. Ze tří paralelních měření byla stanovena

průměrná hodnota aktivity, směrodatná odchylka měření a zpracován graf závislosti specifické aktivity enzymu na teplotě.

Stanovení aktivity v rozpouštědlech a anorganických solích probíhalo stejným postupem, ale část pufru byla nahrazena rozpouštědlem nebo solí.

3.5.5.3. Stanovení kinetických parametrů β -N-acetylhexosaminidas

Stanovení bylo prováděno diskontinuální metodou, kdy byly reakční směsi o různých koncentracích substrátu (0,1-4,5 mM) vytemperovány v termomixéru na 25 °C při 850 ot./min. Reakce byla zahájena přidavkem enzymu. Z reakční směsi o celkovém objemu 400 μ l bylo od druhé minuty v minutových intervalech odebíráno 50 μ l do 96 jamkové mikrotitrační destičky, která obsahovala 100 μ l 1M uhličitanu sodného pro zastavení reakce. Reakce byly prováděny ve třech nezávislých stanoveních. Následně byla na přístroji Sunrise Tecan změřena absorbance při 420 nm. Tato absorbance je přímo úměrná množství uvolněného *p*-nitrofenolu (konstanta z kalibrační přímky $K = 2525,2 \text{ M}^{-1}$). Z lineární závislosti množství uvolněného *p*-nitrofenolu (produktu reakce) na čase reakce byla získána počáteční rychlost reakce v_0 (M/min) jako směrnice přímky. Hodnoty v_0 byly vyneseny v závislosti na koncentraci substrátu v reakční směsi v programu GraphPad Prism dle vzorce:

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E]_t \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde k_{cat} značí číslo přeměny [min^{-1}], $[E]_t$ koncentraci enzymu, $[S]$ koncentraci substrátu a K_m Michaelisovu konstantu [mM]

3.5.6. Enzymová syntéza sacharidů

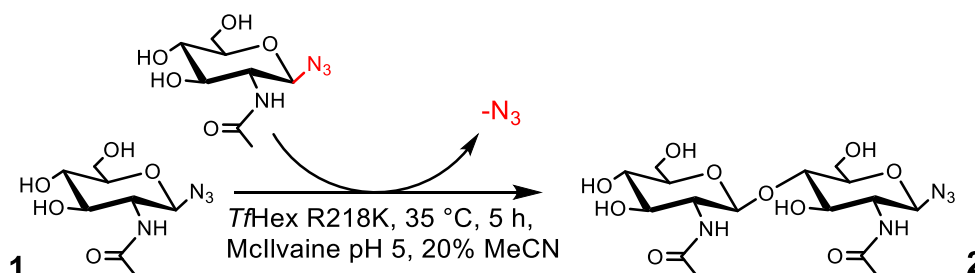
3.5.6.1. Metody analýzy reakčních směsí sacharidů

Základní metodou pro analýzu průběhu transglykosylačních reakcí je tenkovrstvá chromatografie (TLC). Vzorek byl nanášen skleněnou kapilárou do vrstvy silikagelu, kterou byl potažen hliníkový plíšek. Vzorek byl vložen do komůrky obsahující vrstvu mobilní fáze, kterou byl vzorek unášen. Po vyvinutí byla TLC deska vysušena, zkontrolována pod UV světlem a označeny UV aktivní molekuly, které zhášejí UV světlo. Následně byla deska ponořena do roztoku 5% kyseliny sírové v ethanolu. Nanesené vzorky byly karbonizovány horkovzdušnou pistolí při teplotě 250 °C.

Druhou metodou byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vzorek byl separován pomocí gradientové hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) silikagelovou kolonou s navázanými karbamoylovými zbytky. Mobilní fáze byla acetonitril/voda (gradient 0-7 min 78/22, 8-20 min 65/35, 21-25 min 65/35, 26-35 min 78/22). Separace probíhala při teplotě 25 °C. Čistota vzorků byla stanovena pomocí detektoru diodového pole. Pokud bylo potřeba stanovit přítomnost látky v reakční směsi, byl použit hmotnostní spektrometr, kdy byl vzorek ionizován pomocí elektrospreje a ionty byly analyzovány kvadrupólovým analyzátozem.

3.5.6.2. Disacharid β -D-GlcNAc(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-N₃

Disacharid β -D-GlcNAc(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-N₃ (**2**) byl připraven z β -D-GlcNAc-N₃ (**1**) podle reakčního schématu na Obr. 10. Do tří mikrozkušavek bylo naváženo 62 mg glykosidu **1**, který zde plnil funkci donoru i akceptoru. Glykosid byl rozpuštěn ve 392,4 μ l McIlvaineova pufru pH 5 s přídavkem 100 μ l acetonitrilu. Reakční směs byla vytemperována na teplotu 35 °C a byla zahájena reakce přídavkem mutantní *Tf*Hex R218K (2,6 μ l; 1,5 U). Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) každých 60 minut, reakce byla ukončena po 4 hodinách varem (2 min).

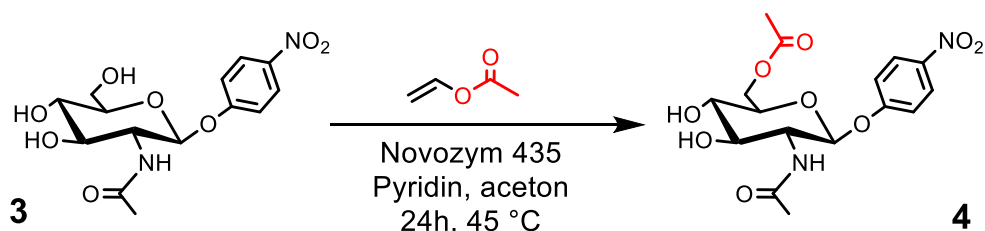


Obrázek 10 Enzymová syntéza disacharidu 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosylazidu (**2**) z 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosylazidu (**1**), který zde zastává funkci donoru i akceptoru, za katalýzy mutantní β -N-acetylhexosaminidasou z *T. flavus* R218K (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

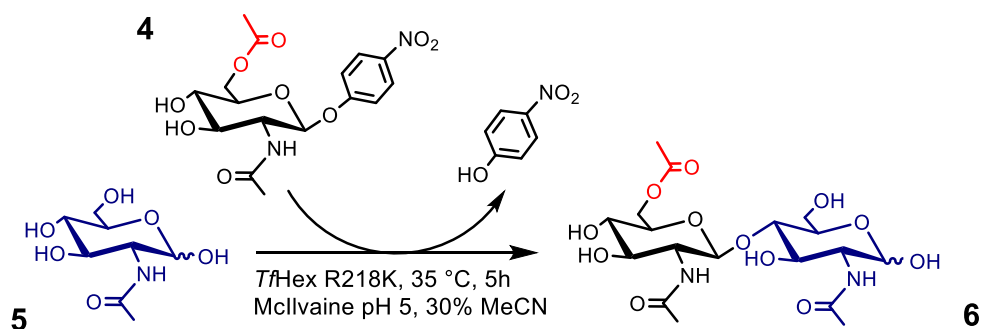
3.5.6.3. Disacharid 6'-O-Ac-β-D-GlcNAc-(1→4)-D-GlcNAc

Pro přípravu funkcionalizovaného disacharidu 6'-O-Ac-β-D-GlcNAc-(1→4)-D-GlcNAc (**6**) bylo nutné nejprve připravit prekurzor *p*NP-6'-O-Ac-β-D-GlcNAc (**4**) podle reakčního schématu na Obr. 11. Příprava probíhala podle P. Simerská a kol. [70]. 200 mg *p*NP-GlcNAc (**3**) bylo rozpuštěno v 15 ml pyridinu, poté bylo přidáno 21 ml acetonu a 7,1 ml vinylacetátu. Reakce byla spuštěna přidavkem 2 mg komerční lipasy z *Candida antantica* imobilizované na pryskyřicovém nosiči Novozym 435. Po 24 hodinách byla reakční směs rozředěna, zfiltrována přes filtrační papír a odpařena s toluenem na rotační vakuové odparce.

K přípravě funkcionalizovaného disacharidu **6** (Obr. 12) byl použit donor **4** (30 mM) a akceptor GlcNAc (**5**, 500 mM). Reakce probíhala ve 30% acetonitrilu v McIlvainově pufru pH 5 při 35 °C a 850 ot./min. Do čtyř mikrozkupek byl navážen donor **4** (4×12 mg) a akceptor **5** (4×11 mg), následně bylo do každé zkumavky přidáno 675,6 µl pufru a 300 µl acetonitrilu jako kosolventu, reakční směs byla promíchána a vytemperována v termomixéru na 35 °C. Po rozpuštění substrátů byla do reakční směsi přidána mutantní *Tf*Hex R218K (24,4 µl; 7 U), čímž byla zahájena reakce. Průběh reakce byl sledován TLC každých 60 minut, reakce byla ukončena po 5 hodinách varem.



Obrázek 11 Enzymová syntéza selektivně chráněného substrátu *p*-nitrofenyl-6-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosidu (**4**) z *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosidu (**3**) v prostředí pyridin/aceton, 3/4, za katalýzy lipasou Novozym 435; acetylačním činidlem byl vinylacetát (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

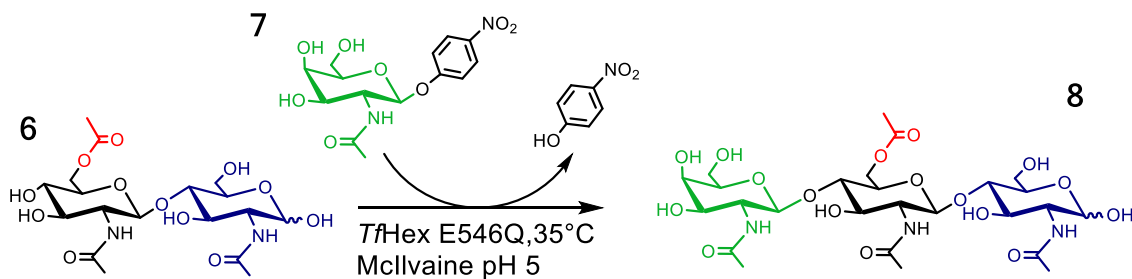


Obrázek 12 Enzymová syntéza disacharidu 6'-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy (**6**) z donoru *p*-nitrofenyl-6-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosidu (**4**) a akceptoru 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy za katalýzy mutantní β -N-acetylhexosaminidasou z *T. flavus* R218K (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

3.5.6.4. Trisacharid β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-6'-O-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc

K přípravě trisacharidu β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-6'-O-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc (**8**) (Obr. 13) byl použit donor *p*NP- β -D-GalNAc (**7**, 30 mM) a akceptor 6'-O-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc (**6**, 100 mM). Reakce probíhala v McIlvainově pufru pH 5 při 35 °C a 1000 ot./min.

Do dvou mikrozkušavek byl navážen donor **7** (2 \times 6 mg) a akceptor **6** (2 \times 26 mg), do každé zkumavky bylo přidáno 549 μ l pufru, reakční směs byla promíchána a vytemperována v termomixéru na 35 °C. Po rozpuštění akceptoru byla do reakční směsi přidána mutantní TfHex E546Q (9 μ l, 1,4 U), čímž byla zahájena reakce. Průběh reakce byl sledován TLC každých 60 minut, reakce byla ukončena po 8 hodinách varem.



Obrázek 13 Enzymová syntéza trisacharidu 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-6'-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy (8) z donoru *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosidu (7) a akceptoru 6'-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy (6) za katalýzy mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasou z *T. flavus* E546Q (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

3.5.6.5. Zpracování reakčních směsí a izolace produktů

Reakce katalyzované β -*N*-acetylhexosaminidasami byly ukončeny varem po dobu 2 minut. Následně byl reakční směs stočený 10 minut při 13 500 ot./min, supernatant byl odebrán do baňky a pelet resuspendován v 200 μ l destilované vody a znovu centrifugován za stejných podmínek. Spojené supernatanty byly naneseny na kolonu gelové permeační chromatografie Bio-Gel P2, jako mobilní fáze byla použita destilovaná voda o průtoku 7-8 ml/hod. Po nanesení a zasáknutí vzorku byl povrch gelu převrstven destilovanou vodou a zapnut sběrač frakcí. Byly jímány frakce o objemu 2 ml.

Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí tenkovrstvé chromatografie a porovnány se vzorkem reakční směsi. Frakce obsahující produkt a zbylé reaktanty byly spojeny a zlyofilizovány. Čistota produktů byla ověřena pomocí HPLC a struktura pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR); tyto analýzy byly provedeny ve spolupráci s kolegy v laboratoři.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Příprava a charakterizace mutantních β -N-acetylhexosaminidas z *Talaromyces flavus*

V rámci této práce byly studovány celkem tři bodové mutace genu *Tfhex*, které byly dříve navrženy na základě molekulárního modelování (Ing. Natalia Kulik, Ph.D., MBÚ AV ČR) jako perspektivní pro zvýšení selektivity této promiskuitní β -N-acetylhexosaminidasy (poměr GalNAcasové/ GlcNAcasové aktivity u divokého kmene je 1,2) k substrátu *p*NP-GalNAc nebo *p*NP-GlcNAc. Změna této základní vlastnosti β -N-acetylhexosaminidas – poměru GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity – pomocí cílené mutagenese nebyla v literatuře ještě nikdy studována. Budová mutace R218K měla vést ke zvýšení GlcNAcasové aktivity a bodové mutace E546Q a E546H ke zvýšení GalNAcasové aktivity enzymu. U dvou z těchto mutantních variant (R218K a E546Q) jsme vycházeli pro tuto práci z již připravených kryokonzervovaných kultur, vyprodukovali jsme požadované enzymy v preparativním měřítku a charakterizovali je. U mutantní varianty E546H jsme nakonec vycházeli z komerčního plasmidu nesoucího požadovaný gen.

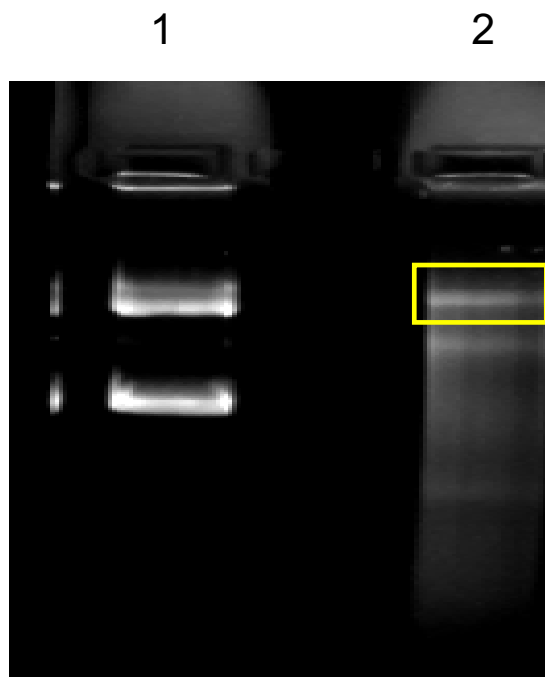
4.1.1. *TfHex* E546H

K vytvoření nové mutantní β -N-acetylhexosaminidasy *TfHex* E546H byla použita metoda mutagenese pomocí PCR, kdy jsou do PCR reakce vloženy komplementární primery nesoucí požadovanou jednobodovou mutaci. Reakce byla provedena při různých teplotách nasedání primerů od 52 do 57 °C. Byly vyzkoušeny dvě komerční DNA polymerasy (*NZYSpeedy DNA Polymerase* a *NZYProof DNA Polymerase*) a různá složení PCR reakčních směsí s optimalizací koncentrace jednotlivých složek, přidání stabilizátoru doporučeného výrobcem (*NZYTaq 5× Optimizer Solution*). Optimální se zdála být teplota 55 °C; na Obr. 14 je vidět proužek odpovídající standardu *TfHex* E546Q, ze kterého byl nový mutant připravován. Koncentrace DNA získaná PCR reakcí byla však ve všech případech příliš nízká, takže nedošlo k úspěšnému zatransformování PCR produktu do *E. coli* Top10. Proto byla nakonec z časových důvodů zvolena varianta objednání syntetického plasmidu *TfHex* E546H (Generay Biotech Co., Ltd., Čína).

Syntetický plazmid byl transformován do *E. coli* Top10 a bakterie nesoucí gen pro produkci β -N-acetylhexosaminidasy byly namnoženy v tekutém LB médiu pod

selekčním tlakem zeocinu. Namnožený plasmid byl izolován pomocí komerčního kitu *High Pure Isolation Kit*. Plasmid byl připraven v dostatečném množství a čistotě (2,9 mg/ml, čistota 1,6) pro elektroporaci do *P. pastoris*.

Nejprve byl připravený plasmid (30 µg) linearizován restrikční endonukleasou *SacI* a purifikován kitem *Jetquick Gel Extraction Spin Kit*. Následně byla provedena elektroporace do kompetentních buněk *P. pastoris* KM71H dle postupu popsáno v kap. 3.5.3.1 a 3.5.3.2. Buňky byly kultivovány na YPDS agaru se zeocinem.



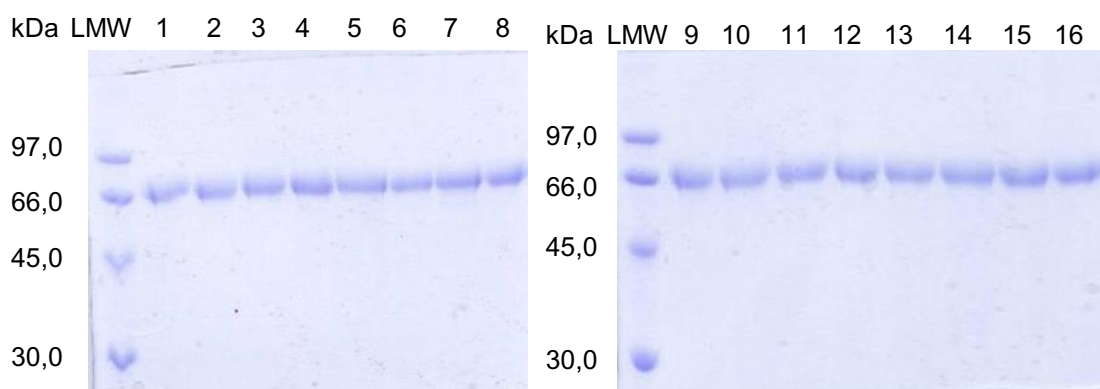
Obrázek 14 Separace plazmidu *Tfhex* E546H v 1% agarosovém gelu. V dráze 1 je nanesen standard *TfHex* E546Q, dráha 2 obsahuje produkt PCR *TfHex* E546H vytvořený mutagenezí pomocí PCR s teplotou nasednutí primerů 55 °C. Žlutý rámeček označuje proužek odpovídající standardu.

4.1.1.1. Analýza produkce *TfHex E546H* v koloniích *P. pastoris*

Z misek s narostlými koloniemi po elektroporaci bylo vybráno šestnáct kolonií a zaočkováno do plného média. Byla provedena zkušební kultivace v malém množství média dle postupu v kapitole 3.5.3.3. Cílem bylo najít kolonie extracelulárně produkující požadovaný protein a zjistit, jak se vlivem vnesené mutace změnila enzymová aktivita.

Na SDS elektroforézu v polyakrylamidovém gelu byl nanesen vzorek zakoncentrovaného média z každé kultivace a marker LMW. Touto metodou byla vyhodnocena exprese proteinu o odpovídající velikosti. Na Obr. 15 je vidět, že ve všech zaočkovaných koloniích byl exprimován protein o očekávané velikosti katalytické podjednotky 65 kDa.

Dále byla stanovena GlcNAcasová a GalNAcasová aktivita z kultivačního média, kdy bylo zjištěno, že vyprodukovaný mutantní enzym je aktivní, a proto byl z aktivit vypočten orientační poměr těchto aktivit. Z výsledků v Tab. 1 vyplývá, že mutací E646H bylo dosaženo posunu substrátové specifity ve prospěch GalNAcasy, jak bylo predikováno pomocí molekulárního modelování. Byly vybrány tři kolonie produkující β -*N*-acetylhexosaminidasu s nejvyšším poměrem GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity. (kolonie 7, 15 a 16, viz Tab. 1). Tyto kolonie byly kryokonzervovány a následně byl vyprodukován čistý enzym. Hodnoty uvedené v Tab. 1 jsou jen orientační, dochází zde k velké chybě vlivem nízkého ředění oproti purifikovanému enzymu.



Obrázek 15 Analýza exprese *TfHex E546H* v koloniích *P. pastoris* 1-16 pomocí SDS-PAGE

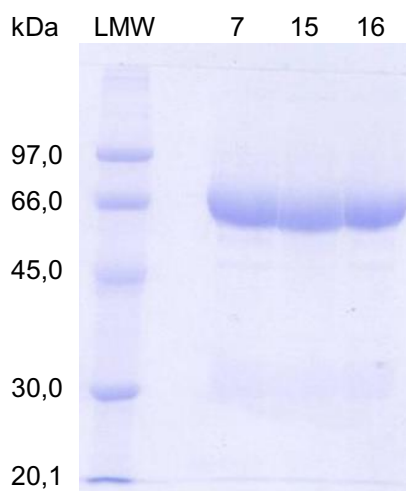
Tabulka 1 Orientační stanovení aktivit *TfHex* E546H exprimované v *P. pastoris*

Kolonie	GlcNAcasa [U/ml]	GalNAcasa [U/ml]	GalNAcasa/ GlcNAcasa
1	0,016	0,296	19
2	0,011	0,252	22
3	0,010	0,145	15
4	0,012	0,255	21
5	0,011	0,228	21
6	0,011	0,253	23
7	0,011	0,363	33
8	0,007	0,169	25
9	0,016	0,380	23
10	0,021	0,411	20
11	0,017	0,366	21
12	0,015	0,256	17
13	0,018	0,306	17
14	0,012	0,199	17
15	0,021	0,519	25
16	0,015	0,439	30

4.1.1.2. Produkce a purifikace *TfHex* E546H

Mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasa byla extracelulárně vyprodukovaná ze tří kryokonzervovaných kolonií *P. pastoris* nesoucích gen *TfHex* E546H, které byly ve screeningu (viz kap. 4.1.1.1) vybrány jako nejvhodnější producenti. β -*N*-Acetylhexosaminidasa vyprodukovaná koloniemi 7, 15 a 16 byly purifikována iontově výměnnou chromatografií na silném katexu při pH 3,5 za použití systému Äkta Prime Plus. Čistota purifikovaného enzymu byla ověřena SDS elektroforézou (Obr. 16) a v průběhu zpracování byla sledována koncentrace proteinů a výtěžek zpracování proteinu, což je shrnuto v Tab. 2. Dále byla sledována GlcNAcasová a GalNAcasová aktivita (Tab. 3). Byla provedena vždy tři paralelní stanovení aktivity, z nichž byl vypočten interval spolehlivosti při konfidenční hladině 0,95.

Ze 200 ml média bylo získáno 90 mg čisté *TfHex* E546H z kolonie 7, 83 mg z kolonie 15 a 88 mg z kolonie 16. Poměr GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity u purifikovaného enzymu byl 4,9 u kolonií 7 a 16 a 7,0 u kolonie 15. Pro další charakterizaci byla vybrána β -*N*-acetylhexosaminidasa produkovaná kolonií 15.



Obrázek 16 SDS-PAGE purifikované *TjHex* E546H produkované koloniemi *P. pastoris* č. 7, 15 a 16

Tabulka 2 Průběh purifikace *TjHex* E546H

	GalNAcasa [U]	Proteiny [mg]	GalNAcasa [U/mg]	Výtěžek [%]
Kolonie 7				
Médium	95 ± 5	135 ± 5	0,70 ± 0,04	100
Purifikovaný enzym	79 ± 2	119 ± 3	0,66 ± 0,02	88
Zakoncentrovaný enzym	72 ± 4	90 ± 2	0,79 ± 0,05	66
Kolonie 15				
Médium	114 ± 7	146 ± 2	0,77 ± 0,05	100
Purifikovaný enzym	97 ± 5	139 ± 3	0,70 ± 0,04	95
Zakoncentrovaný enzym	61 ± 4	83 ± 3	0,75 ± 0,04	57
Kolonie 16				
Médium	153 ± 7	221 ± 9	0,69 ± 0,03	100
Purifikovaný enzym	93 ± 3	197 ± 8	0,47 ± 0,01	89
Zakoncentrovaný enzym	72 ± 2	88 ± 3	0,82 ± 0,01	40

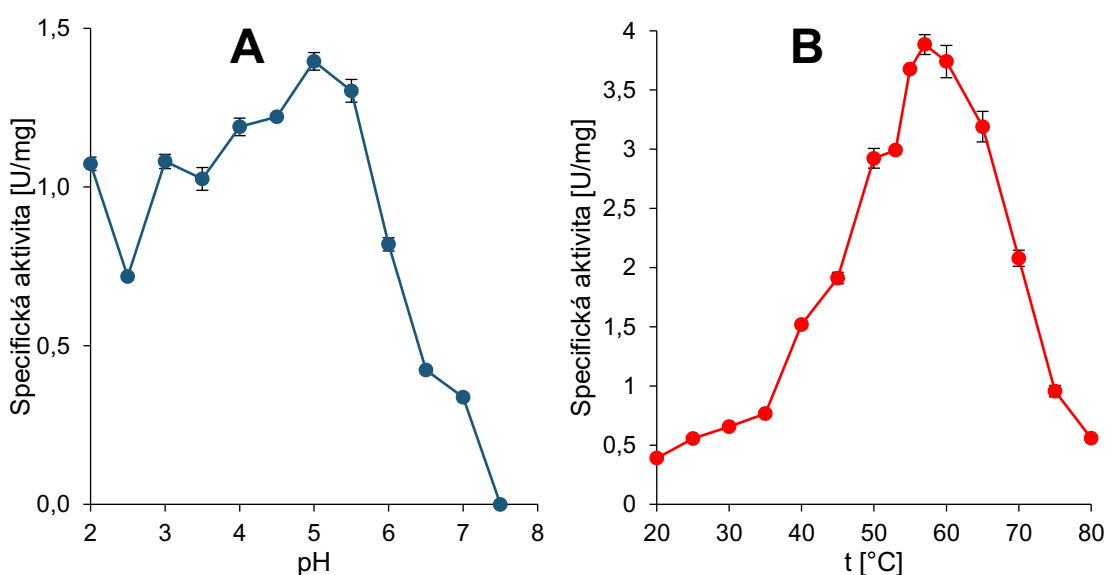
Tabulka 3 Poměr GlcNAcasové a GalNAcasové aktivity purifikované *TjHex* E546H

	GlcNAcasa [U/mg]	GalNAcasa [U/mg]	GalNAcasa/ GlcNAcasa
Kolonie 7	0,16 ± 0,01	0,79 ± 0,05	4,9
Kolonie 15	0,10 ± 0,01	0,75 ± 0,04	7,1
Kolonie 16	0,17 ± 0,03	0,82 ± 0,01	4,8

4.1.1.3. pH a teplotní optimum *TfHex E546H*

pH optimum bylo stanoveno pro GalNAcasovou aktivitu, která je majoritní složkou *TfHex E546H*. Stanovení bylo provedeno v prostředí univerzálního Britton-Robinsonova pufru v rozmezí hodnot pH od 2-8 při 35 °C. Byla provedena tři paralelní stanovení, z nichž byla vypočítána specifická aktivita pro substrát *pNP*-GalNAc a směrodatná odchylka. Z vypočtených hodnot byl sestaven graf závislosti specifické aktivity na pH (Obr. 17A). Z grafu bylo stanoveno pH optimum o hodnotě pH 5.

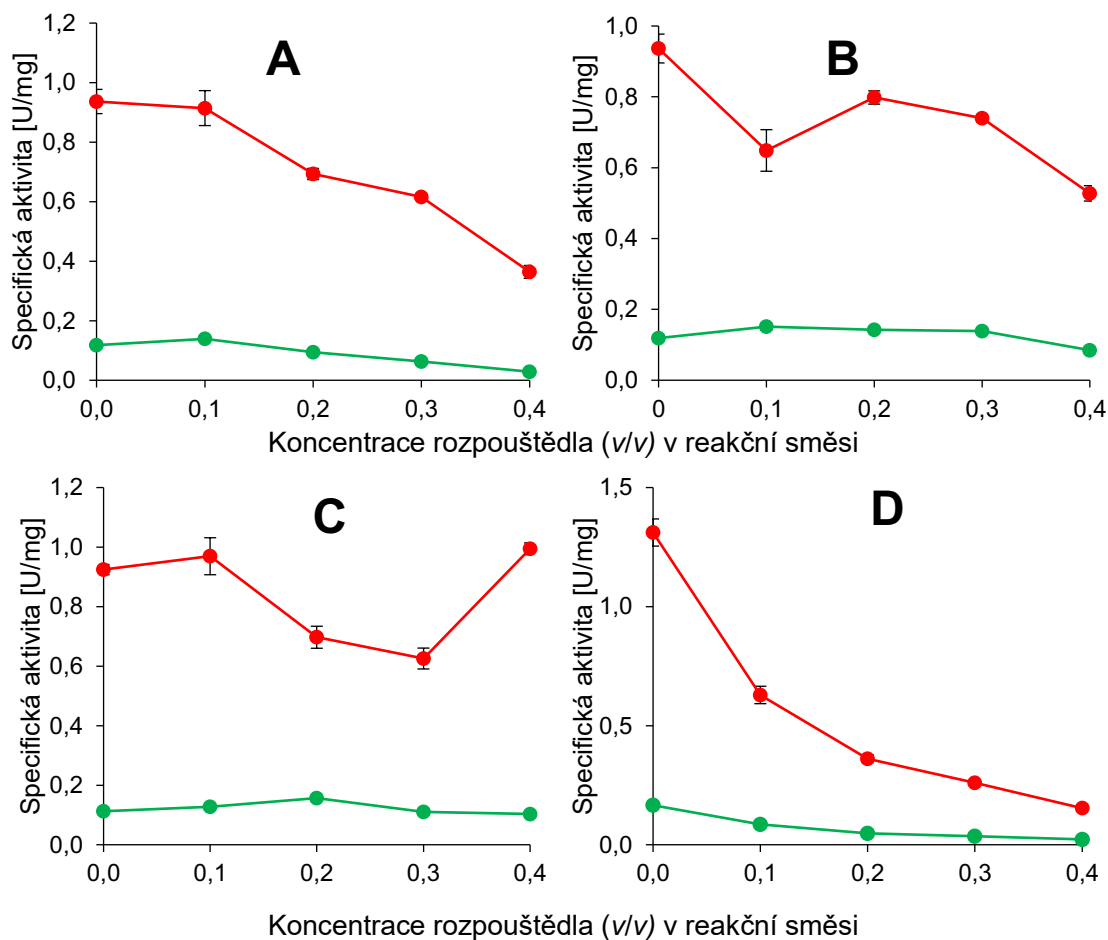
Teplotní optimum bylo měřeno v McIlvainově pufru pH 5 od teploty 20 °C. Teplota reakční směsi byla zvyšována o 5 °C do 80 °C, pro každou teplotu byla provedena tři paralelní stanovení, byla vypočtena specifická GalNAcasová aktivita a směrodatná odchylka. Ze získaných hodnot byl sestaven graf závislosti specifické aktivity na teplotě (Obr. 17B). Na grafu je patrné teplotní optimum při 60 °C. Avšak tato teplota není vhodná pro transglykosylační reakce, jelikož v experimentech byla měřena aktivita hydrolytická, která by v 60 °C převážila nad transglykosylační. Druhým důvodem je nízká stabilita enzymu v této teplotě. Transglykosylační reakce obvykle probíhají okolo 5 hodin a při inkubaci při 60 °C byl po 1 hodině enzym již inaktivován.



Obrázek 17 Závislost specifické GalNAcasové aktivity na pH (A) a teplotě (B) reakční směsi

4.1.1.4. Vliv organických rozpouštědel na aktivitu TjHex E546H

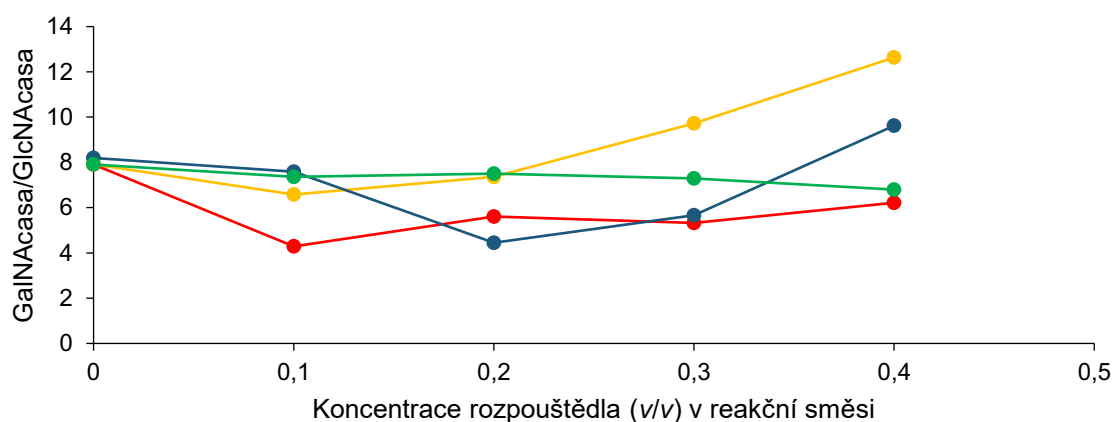
Byla vybrána čtyři rozpouštědla jako perspektivní pro diskriminaci jedné z aktivit β -*N*-acetylhexosaminidasy a případné další zvýšení selektivity mutantního enzymu [71]. V prostředí acetonitrilu, propan-2-olu, *tert*-butanolu a acetonu o různých koncentracích v McIlvainově pufru pH 5 byla stanovena GlcNAcasová a GalNAcasová aktivita a vynesena do grafu na Obr. 18. Ze získaných hodnot byl stanoven poměr GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity, který byl vynesena do grafu na Obr. 19.



Obrázek 18 Závislost specifické aktivity TjHex E546H na koncentraci rozpouštědla v reakční směsi. **A** acetonitril, **B** propan-2-ol, **C** *tert*-butanol, **D** aceton, GlcNAc zeleně, GalNAc červeně.

V reakční směsi obsahující acetonitril o koncentraci 0,3 a 0,4 (v/v) bylo dosaženo zvýšení selektivity GalNAcasové aktivity 1,2 – 1,5 \times . Na Obr. 18A je vidět, že obě složky vykazují klesající trend, GlcNAc klesla 5 \times zatímco GalNAc 2,5 \times . Přídavkem propan-2-olu do reakční směsi došlo ke snížení selektivity enzymu (Obr. 18B).

Terc-butanol o koncentraci 0,2 a 0,3 (v/v) způsobil taktéž snížení selektivity enzymu. Přítomnost acetonu v reakční směsi inaktivovala obě enzymové aktivity a neovlivnila selektivitu (Obr. 18C).

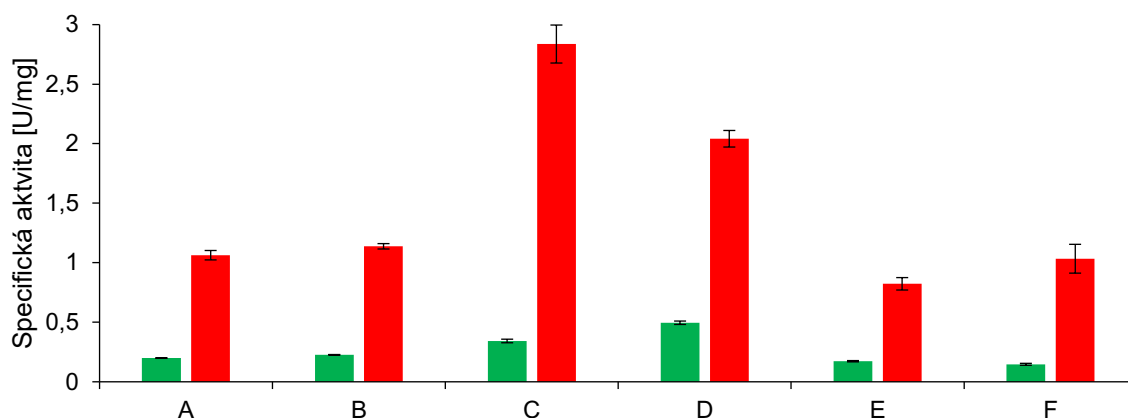


Obrázek 19 Závislost poměru GalNAcase a GlcNAcase aktivity na koncentraci rozpouštědla v reakční směsi. Rozpouštědla: acetonitril **žlutě**, propan-2-ol **červeně**, *tert*-butanol **modře**, aceton **zeleně**.

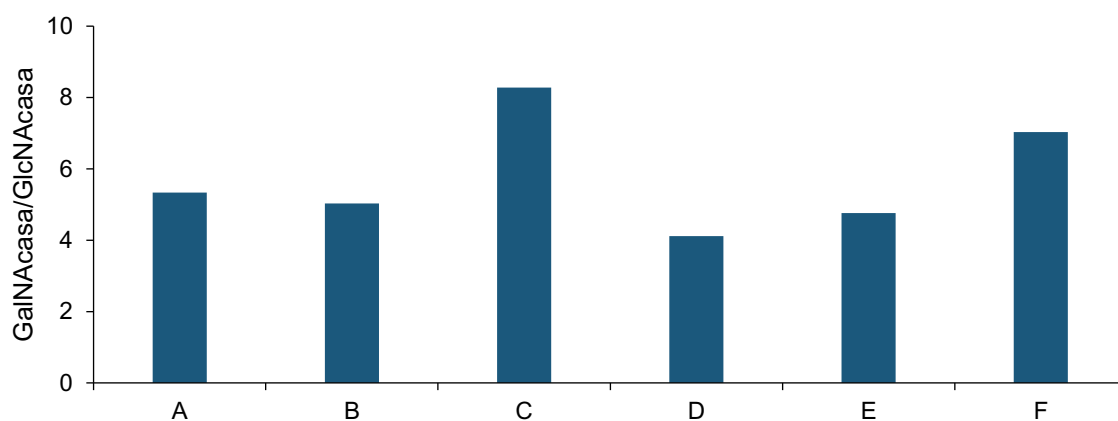
4.1.1.5. Vliv solí na aktivitu *TfHex* E546H

Substrátovou specifitu β -*N*-acetylhexosaminidas lze ovlivnit přítomností anorganických solí v reakční směsi. V tripletech byla stanovena GalNAcase a GlcNAcase aktivita *TfHex* E546H v přítomnosti 0,5M chloridu lithného (B) a vápenatého (C), síranu amonného (D), zinečnatého (E) a hořečnatého (F) v reakční směsi. Ze získaných hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka, sestaven graf závislosti specifické aktivity na soli (Obr. 20) a graf závislosti poměru GalNAcase a GlcNAcase na soli (Obr. 21).

Z grafu na Obr. 20 vyplývá, že přítomnost chloridu lithného (B) v reakční směsi výrazně neovlivnila GalNAcase ani GlcNAcase. Chlorid vápenatý (C) způsobil nárůst poměru GalNAcase/GlcNAcase o 50 %. Změnu substrátové specifity o 30 % ve prospěch GalNAcase způsobil i síran hořečnatý (F). Síran amonný (D) i síran zinečnatý (E) naopak snížily selektivitu enzymu.



Obrázek 20 Závislost specifické aktivity *TjHex* E546H na obsahu 0,5M soli. **A** bez soli, **B** chlorid lithný, **C** chlorid vápenatý, **D** síran amonný, **E** síran zinečnatý, **F** síran hořečnatý, GlcNAcase **zeleně**, GalNAcase **červeně**.

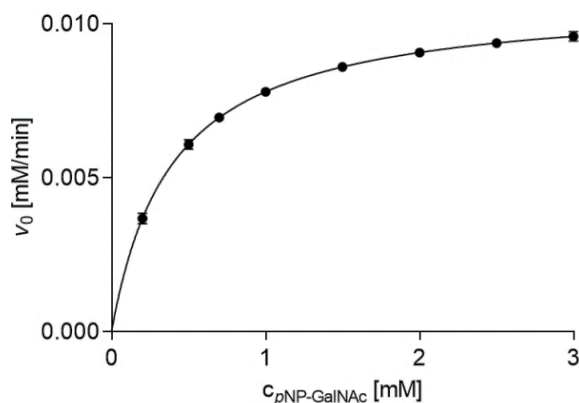


Obrázek 21 Závislost poměru GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity na obsahu 0,5M soli. **A** bez soli, **B** chlorid lithný, **C** chlorid vápenatý, **D** síran amonný, **E** síran zinečnatý, **F** síran hořečnatý.

4.1.1.6. Enzymová kinetika *TjHex* E546H

Se substrátem *p*NP-GalNAc o koncentraci 0,2 – 3 mM byla provedena tři nezávislá stanovení kinetických parametrů. Reakce byla zahájena přidavkem enzymu do reakční směsi, byla proměřena počáteční rychlost reakce pro každou koncentraci substrátu a byl vypracován graf závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu (Obr. 22).

Pomocí programu GraphPad Prism byl graf vyhodnocen a stanovena $K_m = 0,39 \pm 0,02$ mM a $k_{cat} = 0,6 \pm 0,1$ s⁻¹.

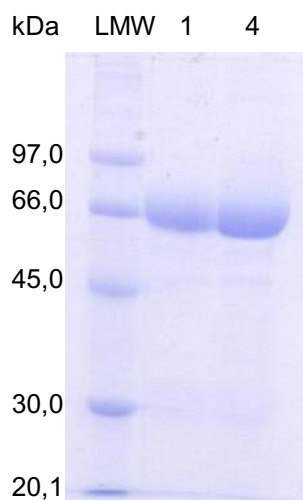


Obrázek 22 Kinetická křivka hydrolyzy *p*NP-GalNAc za katalýzy *Tf*Hex E546H.

4.1.2. *Tf*Hex E546Q

Druhý mutantní enzym této práce, *Tf*Hex E546Q, byl vyprodukován z kryokonzervovaných kultur *P. pastoris* nesoucích mutantní gen *Tfhex* E546Q. Byly studovány dvě kolonie *P. pastoris*, 1 a 4. Extracelulárně produkovaný enzym byl purifikovaný pomocí iontové výměnné chromatografie na silném katexu při pH 3,5 se systémem Äkta Prime Plus. Čistota enzymu byla ověřena SDS elektroforézou (Obr. 23) a v průběhu zpracování byla sledována koncentrace proteinů a výtěžek zpracování proteinu (Tab. 4). Dále byla sledována GlcNAcasová a GalNAcasová aktivita (Tab. 5). Byla provedena tři paralelní stanovení, z nichž byl vypočten interval spolehlivosti při konfidenční hladině 0,95.

Ze 400 ml média bylo získáno 104 mg *Tf*Hex E546Q z kolonie 1 a 96 mg z kolonie 4. U β -*N*-acetylhexosaminidasy vyprodukované z obou kultur byl poměr GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity roven přibližně 6,3. Bodovou mutací byla tak posunuta substrátová specifita ve prospěch GalNAcasy. Pro další stanovení byla vybrána β -*N*-acetylhexosaminidasa s vyšším výtěžkem i aktivitou, a to β -*N*-acetylhexosaminidasa produkovaná kolonií 1.



Obrázek 23 SDS-PAGE purifikované *TfHex* E546Q produkované koloniemi 1 a 4 *P. pastoris*.

Tabulka 4 Průběh purifikace *TfHex* E546Q

	GalNacasa [U]	Protein [mg]	GalNacasa [U/mg]	Výtěžek [%]
kolonie 1				
Médium	809 ± 14	146 ± 3	5,5 ± 0,1	100
Purifikovaný enzym	439 ± 19	123 ± 3	3,5 ± 0,2	84
Zakoncentrovaný enzym	361 ± 8	103,8 ± 0,2	3,46 ± 0,07	71
kolonie 4				
Médium	656 ± 18	146 ± 7	4,5 ± 0,1	100
Purifikovaný enzym	316 ± 30	99 ± 2	3,2 ± 0,3	68
Zakoncentrovaný enzym	303 ± 3	96 ± 0,1	3,15 ± 0,04	65

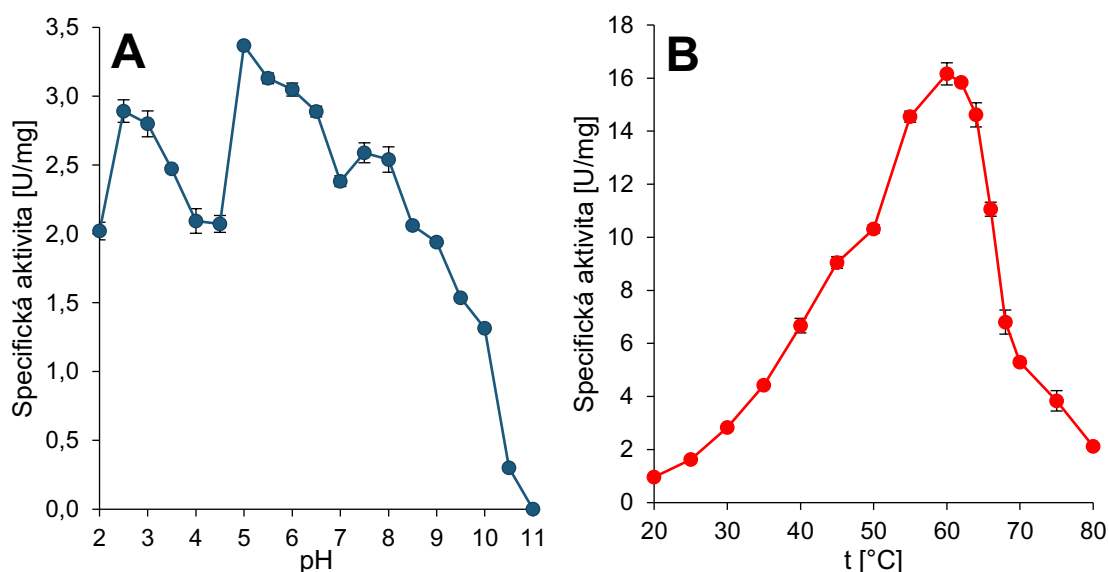
Tabulka 5 Poměr GlcNAcasové a GalNAcasové aktivity purifikované *TfHex* E546Q

	GlcNAcasa [U/mg]	GalNAcasa [U/mg]	GalNAcasa/ GlcNAcasa
kolonie 1	0,54 ± 0,01	3,46 ± 0,07	6,5
kolonie 4	0,50 ± 0,01	3,15 ± 0,04	6,3

4.1.2.1. pH a teplotní optimum *TfHex E546Q*

pH optimum bylo stanoveno pro GalNAcasovou aktivitu jako majoritní složku β -*N*-acetylhexosaminidasy. Stanovení bylo prováděno analogicky jako v případě *TfHex E546H*. Závislost specifické aktivity *TfHex E546Q* na pH je uvedena na Obr. 24A. Z grafu bylo stanoveno pH optimum taktéž o hodnotě pH 5.

Teplotní optimum bylo měřeno v McIlvainově pufru pH 5 od 20 do 80 °C. Ze získaných hodnot byl sestaven graf závislosti specifické aktivity na teplotě (Obr. 24B). Na grafu je patrné teplotní optimum při 60 °C.



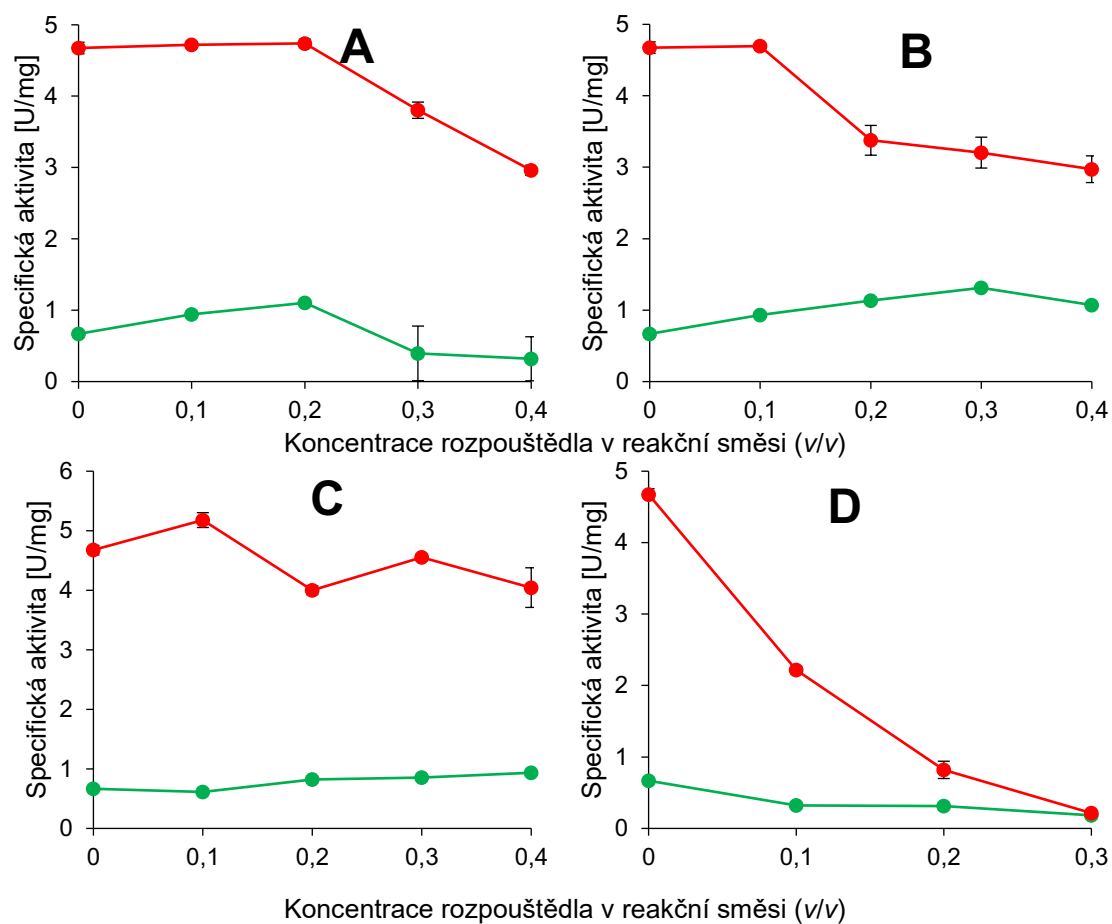
Obrázek 24 Závislost specifické GalNAcasové aktivity na pH (A) a teplotě (B) reakční směsi

4.1.2.2. Vliv organických rozpouštědel na aktivitu *TfHex E546Q*

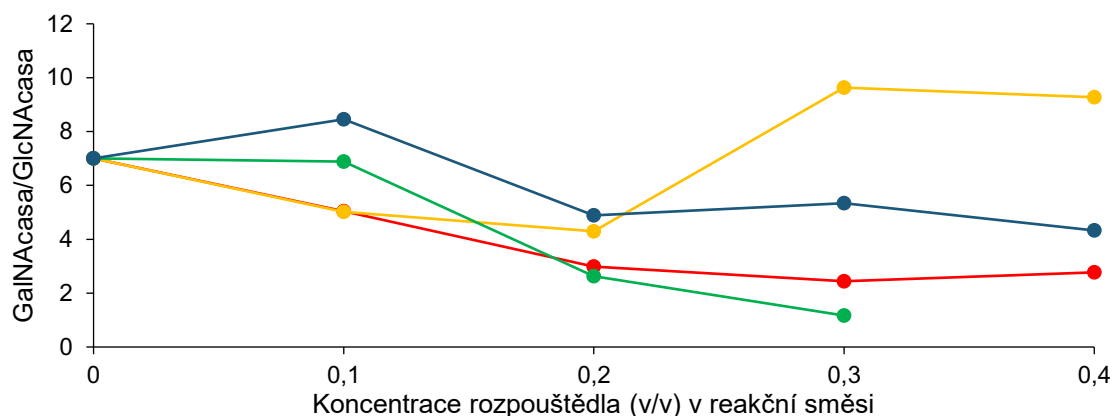
Ve zvolených rozpouštědlech o různých koncentracích (acetonitril, propan-2-ol, *tert*-butanol a aceton) byla stanovena GalNAcasová a GlcNAcasová aktivita, vynesena do grafu (Obr. 25) a byl vypočten poměr těchto aktivit (Obr. 26). Cílem bylo potlačit GlcNAcasovou aktivitu, a tím zvýšit substrátovou specifitu enzymu.

V acetonitrilu o koncentraci 0,3 a 0,4 (v/v) došlo k zvýšení poměru GalNAcasy a GlcNAcasy z původních 7,0 téměř na 10 (Obr. 25A). V prostředí propan-2-olu došlo k aktivaci GlcNAcasové aktivity a potlačení selektivity enzymu (Obr. 25B). V prostředí *tert*-butanolu byl poměr GalNAcasy/GlcNAcasy nejprve zvýšen 1,1 \times , od koncentrace 0,2

(v/v) tento poměr klesl (Obr. 25C). Přítomnost acetonu v reakční směsi způsobila výrazný pokles GalNAcasové aktivity, a tím i selektivity enzymu (Obr. 25D).



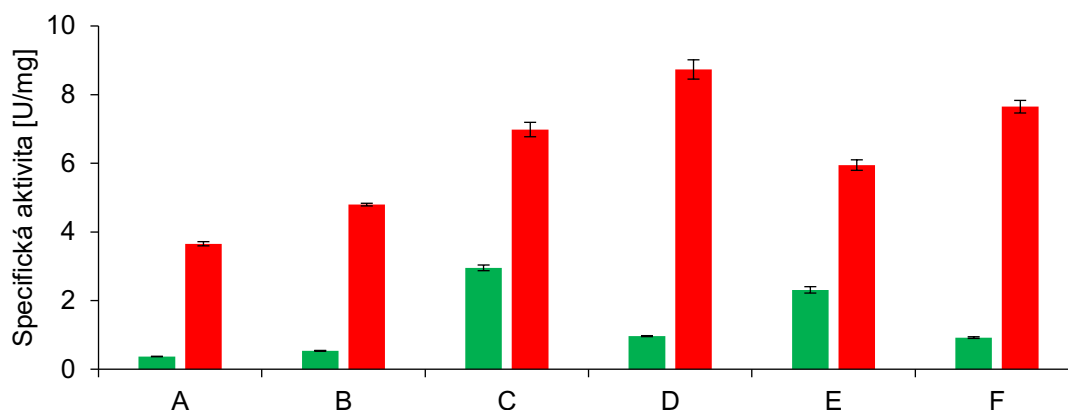
Obrázek 25 Závislost specifické aktivity *TjHex* E546Q na koncentraci rozpouštědla v reakční směsi. **A** acetonitril, **B** propan-2-ol, **C** *tert*-butanol, **D** aceton, GlcNAcase **zeleně**, GalNAcase **červeně**.



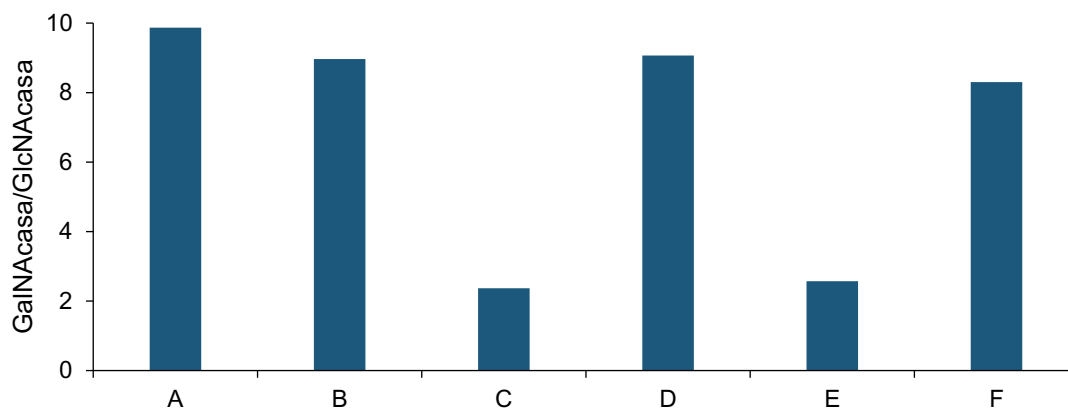
Obrázek 26 Závislost poměru GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity na koncentraci rozpouštědla v reakční směsi. Rozpouštědla: acetonitril **žlutě**, propan-2-ol **červeně**, *tert*-butanol **modře**, aceton **zeleně**.

4.1.2.3. Vliv solí na aktivitu *TfHex E546Q*

Byl studován vliv chloridu lithného a vápenatého, síranu amonného, zinečnatého a hořečnatého (0,5 M) na substrátovou specifitu *TfHex E546Q*. Byla vždy provedena tři paralelní stanovení GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity, vypočtena směrodatná odchylka a sestaven graf závislosti specifické aktivity na soli (Obr. 27) a graf závislosti poměru GalNAcasy a GlcNAcasy na soli (Obr. 28).



Obrázek 27 Závislost specifické aktivity *TfHex E546Q* na obsahu 0,5M soli. **A** bez soli, **B** chlorid lithný, **C** chlorid vápenatý, **D** síran amonný, **E** síran zinečnatý, **F** síran hořečnatý, GlcNAcase **zeleně**, GalNAcase **červeně**.



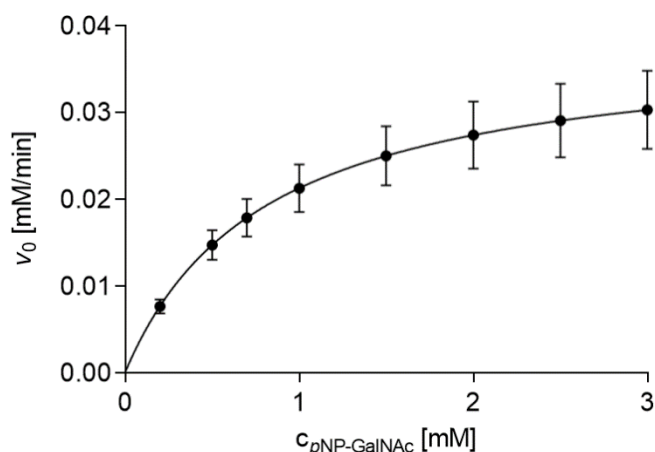
Obrázek 28 Závislost poměru GalNAcase a GlcNAcase aktivity na obsahu 0,5M soli. **A** bez soli, **B** chlorid lithný, **C** chlorid vápenatý, **D** síran amonný, **E** síran zinečnatý, **F** síran hořečnatý.

Z grafu na Obr. 27 je patrné, že u mutantní *TfHex* E546Q dochází k aktivaci jak GlcNAcase, tak GalNAcase vlivem všech přidaných solí. V prostředí chloridu lithného (B), síranu amonného (D) a síranu hořečnatého (F) nebyl výrazně ovlivněn poměr aktivit. Chlorid vápenatý (C) způsobil aktivaci GlcNAcase, a tím ztrátu selektivity enzymu. Obdobný vliv na poměr aktivit měl i síran zinečnatý (E).

4.1.2.4. Enzymová kinetika *TfHex* E546Q

Se substrátem *p*NP-GalNAc byla stanovena Michaelisova konstanta (K_m) a číslo přeměny (k_{cat}) pro *TfHex* E546Q. Byla provedena tři nezávislá stanovení se substrátem o koncentraci 0,2 – 3 mM. Byla analyzována reakční rychlost a vynesena v závislosti na koncentraci substrátu, viz. Obr. 29.

Pomocí programu GraphPad Prism byl graf vyhodnocen a stanovena $K_m = 0,8 \pm 0,2$ mM a $k_{cat} = 4,9 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$.

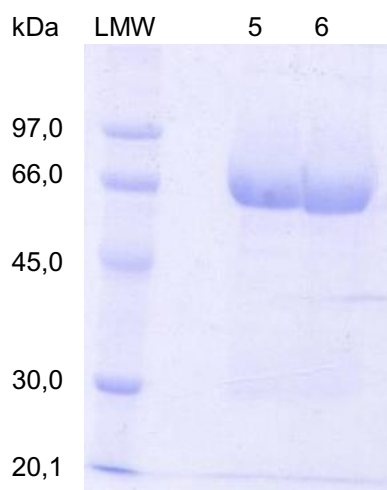


Obrázek 29 Kinetická křivka hydrolyzy *pNP-GalNAc* za katalýzy *TfHex E546Q*.

4.1.3. *TfHex R218K*

Třetí mutantní enzym, *TfHex R218K*, byl též vyprodukován z kryokonzervovaných kultur *P. pastoris* nesoucích mutantní gen *TfHex R218K*. Byly analyzovány dvě kolonie *P. pastoris*, 5 a 6. Extracelulárně produkovaný enzym byl purifikovaný pomocí iontové výměnné chromatografie na silném katexu při pH 3,5 se systémem Äkta Prime Plus. Čistota enzymu byla ověřena SDS elektroforézou (Obr. 30), na kterém je vidět, že byly vyprodukovány enzymy o správně podjednotkové velikosti 65 kDa. V průběhu zpracování byla sledována koncentrace proteinů a výtěžek purifikace (Tab. 6) GlcNAcasová a GalNAcasová aktivita jsou uvedeny v Tab. 7. Byla provedena tři paralelní stanovení, z nichž byl vypočten interval spolehlivosti při konfidenční hladině 0,95.

Ze 400 ml média vyprodukovaného kolonií 5 bylo získáno 72 mg proteinu a z kolonie 6 28 mg proteinu. U β -*N*-acetylhexosaminidasy vyprodukované z obou kultur je poměr GlcNAcasové aktivity roven 0,15, což značí, že se jedná o GlcNAcasu. Pro další stanovení byla vybrána β -*N*-acetylhexosaminidasa produkovaná kolonií 5, která vykazovala vyšší výtěžek enzymu.



Obrázek 30 SDS-PAGE purifikované *TfHex* R218K produkované koloniemi 5 a 6 *P. pastoris*.

Tabulka 6 Průběh purifikace *TfHex* R218K

	GlcNAcasa [U]	Protein [mg]	GlcNAcasa [U/mg]	Výtěžek [%]
kolonie 5				
Médium	3272 ± 25	139 ± 3	23,4 ± 0,2	100
Purifikovaný enzym	2412 ± 205	96 ± 4	25 ± 2	69
Zakoncentrovaný enzym	2641 ± 3	72 ± 4	36 ± 1	52
kolonie 6				
Médium	2400 ± 62	75 ± 1	31,8 ± 0,8	100
Purifikovaný enzym	1088 ± 86	33 ± 2	33 ± 2	44
Zakoncentrovaný enzym	934 ± 3	28 ± 2	32 ± 1	38

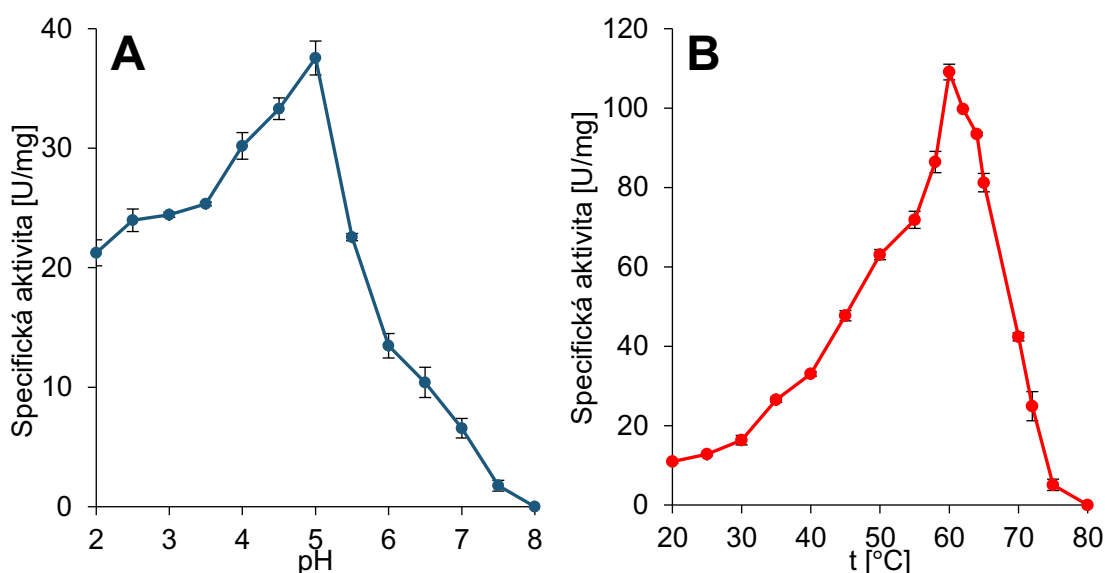
Tabulka 7 Poměr GlcNAcasové a GalNAcasové aktivity purifikované *TfHex* R218K

	GlcNAcasa [U/mg]	GalNAcasa [U/mg]	GalNAcasa/ GlcNAcasa
kolonie 5	36 ± 1	5,3 ± 0,1	0,15
kolonie 6	32 ± 1	4,4 ± 0,4	0,14

4.1.3.1. pH a teplotní optimum *TfHex R218K*

pH optimum β -*N*-acetylhexosaminidasy bylo stanoveno v Britton-Robinsonově pufru pH 2-8. Byla stanovena GlcNAcasová aktivita při teplotě 35 °C. Byla provedena tři paralelní měření, z nichž byla vyhodnocena směrodatná odchylka a vypracován graf závislosti specifické aktivity enzymu na pH (Obr. 31A). Z grafu bylo stanoveno pH optimum o hodnotě pH 5.

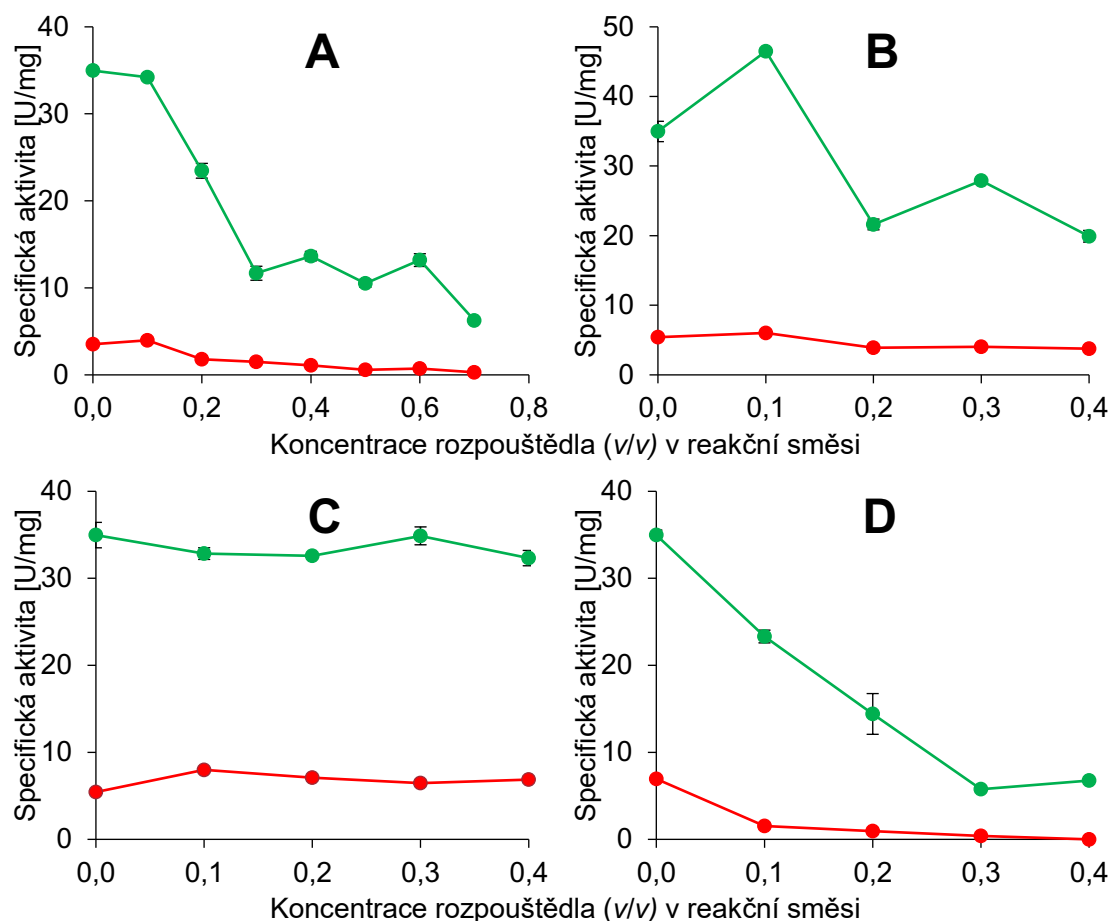
Teplotní optimum bylo stanoveno v McIlvainově pufru pH 5 od 20 °C do 80 °C. Ze tří paralelních měření byla stanovena průměrná hodnota GlcNAcasové aktivity, směrodatná odchylka měření a zpracován graf (Obr. 31B) závislosti specifické aktivity enzymu na teplotě. Teplotní optimum enzymu bylo 60 °C.



Obrázek 31 Závislost specifické GlcNAcasové aktivity na pH (A) a teplotě (B) reakční směsi

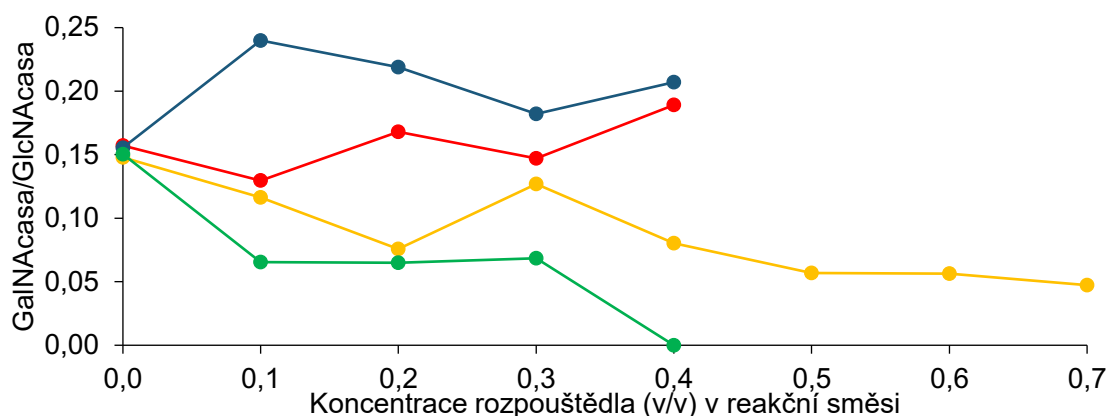
4.1.3.2. Vliv organických rozpouštědel na aktivitu *TfHex R218K*

Jako u předchozích enzymů byla studována aktivita *TfHex R218K* v přítomnosti acetonitrilu, propan-2-olu, *tert*-butanolu a acetonu. Byla stanovena aktivita obou složek β -*N*-acetylhexosaminidasy a vynesena do grafu závislosti specifické aktivity na koncentraci rozpouštědla (Obr.32). Dále byl vyhodnocen poměr GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity (Obr. 33).



Obrázek 32 Závislost specifické aktivity *TjHex* R218K na koncentraci rozpouštědla v reakční směsi. **A** acetonitril, **B** propan-2-ol, **C** terc-butanol, **D** aceton, GlcNAcasa **zeleně**, GalNAcasa **červeně**.

V acetonitrilu byla sice výrazně inaktivována jak GlcNAcasová tak GalNacasová aktivita (Obr. 32A), ale došlo zároveň ke zlepšení selektivity enzymu na poměr GalNacasové a GlcNAcasové aktivity 0,05 v 0,7 (v/v) acetonitrilu. Propan-2-ol (Obr. 32B) a *terc*-butanol naopak selektivitu enzymu mírně zhoršily. Přítomnost acetonu v reakční směsi výrazně snížila jak GlcNAcasu tak i GalNacasu, vlivem acetonu (0,1-0,3 (v/v)). však došlo ke snížení poměru GalNacasy a GlcNacasy na 0,06. V koncentraci 0,4 (v/v) byla GalNAcasa zcela inaktivována, ale GlcNAcasa klesla 6×. Pro další použití se do transglykosylačních reakcí jevila jako nejlepší volba acetonitril o koncentraci 0,3 – 0,7 (v/v), který nejenže výrazně snižoval GalNacasu, ale i zvyšoval rozpustnost *p*-nitrofenyl-substituovaných substrátů.

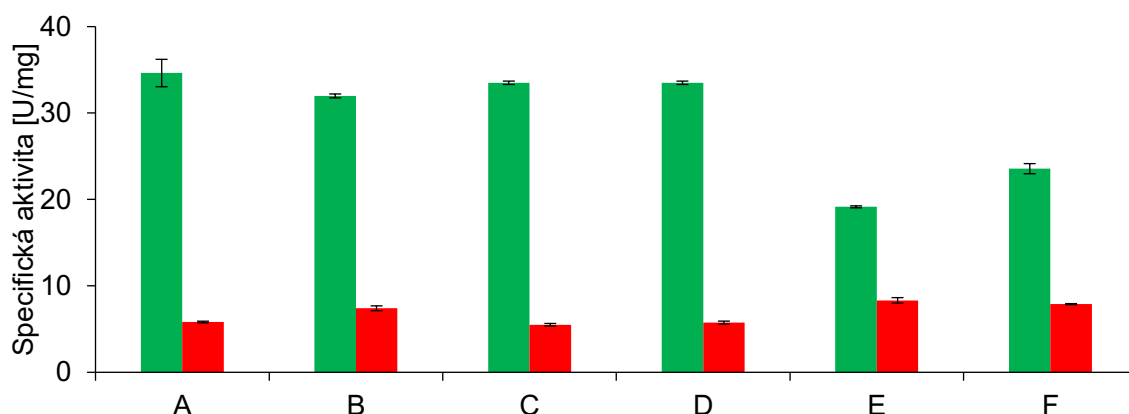


Obrázek 33 Závislost poměru GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity na koncentraci rozpouštědla v reakční směsi. Rozpouštědla: acetonitril **žlutě**, propan-2-ol **červeně**, *tert*-butanol **modře**, aceton **zeleně**.

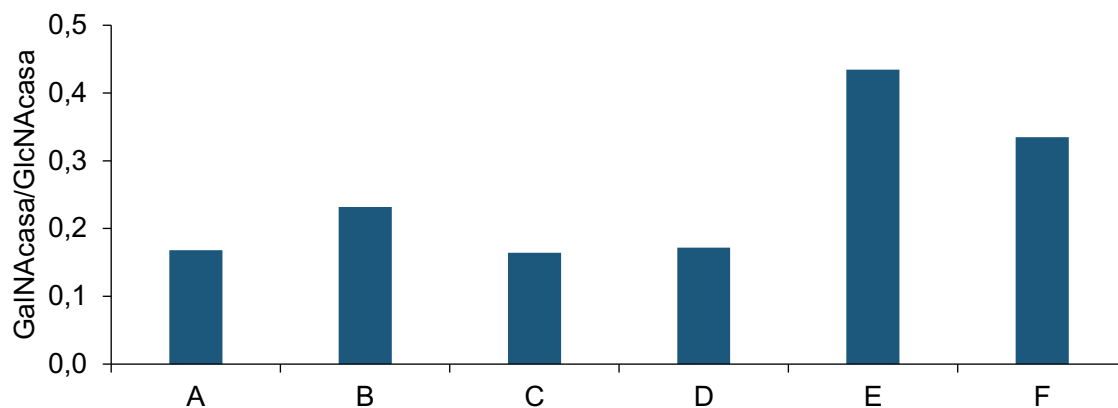
4.1.3.3. Vliv solí na aktivitu *Tf*Hex R218K

Stejně jako u předchozích dvou enzymů byl i u *Tf*Hex R218K analyzován vliv solí na substrátovou specifitu, a to 0,5M chloridu lithného (B), chloridu vápenatého (C), síranu amonného (D), síranu zinečnatého (E) síranu hořečnatého (F). Byly sestaveny grafy závislosti specifické aktivity na soli (Obr. 34) a závislosti poměru GalNAcasy a GlcNAcasy na soli (Obr. 35).

Z grafů vyplývá, že v přítomnosti žádné ze studovaných solí nedošlo ke změně poměru GalNAcasy/GlcNAcasy ve prospěch GlcNAcasy, spíše došlo k mírnému navýšení GalNAcasové aktivity, a tím ztrátě selektivity enzymu.



Obrázek 34 Závislost specifické aktivity *Tf*Hex R218K na obsahu 0,5M soli. A bez soli, B chlorid lithný, C chlorid vápenatý, D síran amonný, E síran zinečnatý, F síran hořečnatý, GlcNAcase **zeleně**, GalNAcase **červeně**.

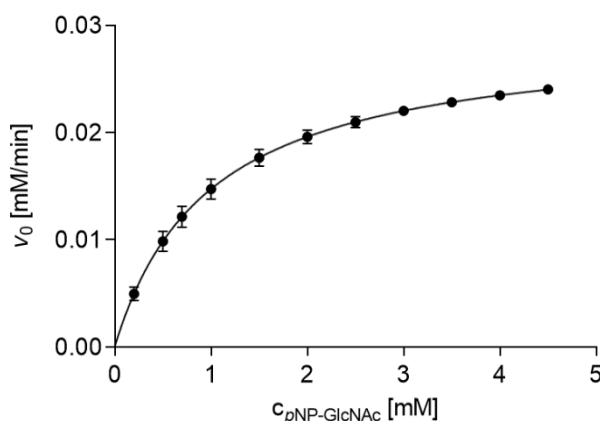


Obrázek 35 Závislost poměru GalNAcase a GlcNAcase aktivity na obsahu 0,5M soli. **A** bez soli, **B** chlorid lithný, **C** chlorid vápenatý, **D** síran amonný, **E** síran zinečnatý, **F** síran hořečnatý.

4.1.3.4. Enzymová kinetika *TfHex* R218K

Se substrátem *pNP*-GlcNAc byla stanovena Michaelisova konstanta (K_m) a konstanta přeměny (k_{cat}) pro *TfHex* R218K. Po zahájení reakce obsahující substrát o koncentraci 0,2–4,5 mM přidávkem enzymu byla proměřena počáteční rychlost hydrolytické reakce pro různé koncentrace substrátu a ze zjištěných hodnot byla sestavena kinetická křivka (Obr. 36).

Pomocí programu GraphPad Prism byla stanovena $K_m = 0,9 \pm 0,2$ mM a $k_{cat} = 29 \pm 1$ s⁻¹.



Obrázek 36 Kinetická křivka hydrolyzy *pNP*-GlcNAc za katalýzy *TfHex* R218K.

4.2. Porovnání vlastností rekombinantních β -*N*-acetylhexosaminidas

V Tab. 8 jsou shrnuty základní biochemické vlastnosti všech tří připravených mutantních variant *Tj*Hex a jejich srovnání s divokým kmenem *Tj*HexWT. Uvedené specifické aktivity jasně ukazují, že poměr GalNAcasové/GlcNAcasové aktivity závisí na vnesené bodové mutaci. Zatímco divoký kmen vykazuje poměr těchto aktivit 1,2, u mutantu R218K tento poměr výrazně klesá na 0,15. Zavedení Lys do aktivního centra místo Arg na pozici 218 zapříčinilo tedy osminásobné zvýšení selektivity enzymu vůči substrátu *p*NP-GlcNAc. Naopak zavedením obou mutací (Asn, His) na pozici 546 místo Asp došlo k více než pětinasobnému zvýšení selektivity vůči *p*NP-GalNAc.

Je pozoruhodné, že u obou mutantních GalNAcas došlo zároveň k výraznému snížení enzymové aktivity (u E546Q 13×, u E546H dokonce 60×). Z toho vyplývá, že pozice E546 je pravděpodobně mnohem citlivější na změny v aminokyselinové sekvenci. Vlivem bodových mutací byla také snížena katalytická účinnost *Tj*Hex oproti divokému typu. Pro GalNAcasu E546Q byla katalytická účinnost snížena 25× a E546H 100×. U mutantu R218K se substrátem *p*NP-GlcNAc došlo ke snížení přibližně 13×. Toto snížení katalytické účinnosti bylo ve všech případech způsobeno primárně výrazným poklesem reakční rychlosti katalýzy (k_{cat}). Vzhledem k vysokému výtěžku levné produkce enzymů toto snížení nepředstavuje zásadní problém, protože do reakce může být snadno přidáno větší množství enzymu ke kompenzaci tohoto problému.

Je třeba zdůraznit, že zatímco β -*N*-acetylhexosaminidasy s přirozeně zvýšenou selektivitou vůči *p*NP-GlcNAc se mezi glykosidasami vyskytují [72], čistě GalNAcasová aktivita je mezi glykosidasami a potažmo i mezi glykosyltransferasami extrémně vzácná [73] a dosud objevené enzymy nemají žádné dokumentované transglykosylační schopnosti. Proto lze říci, že nalezení hned dvou jednobodových mutací, které vedly k více než pětinasobnému navýšení GalNAcasové aktivity, je velice dobrým výsledkem této práce. Vlivem zavedení jednobodových mutací do aktivního centra nebyla způsobena změna pH optima (cca pH 5) ani teplotního optima (60 °C).

Tabulka 8 Porovnání rekombinantního divokého typu *TfHex* WT s mutantními *TfHex*

<i>TfHex</i>	GalNAcasa/ GlcNAcasa	GlcNAcasa		GalNAcasa	
		Aktivita [U/mg]	k_{cat}/K_m^a [mM ⁻¹ ·s ⁻¹]	Aktivita [U/mg]	k_{cat}/K_m [mM ⁻¹ ·s ⁻¹]
WT [74]	1,2	37,4	434	45,1	150
E546H	7,1	0,11	-	0,75	1,6
E546Q	6,5	0,54	-	3,5	6,1
R218K	0,15	36,2	32,2	5,3	-

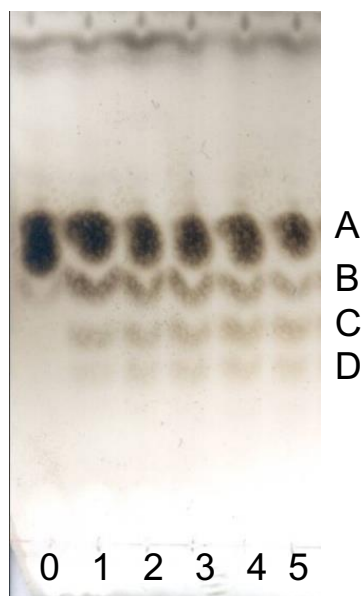
^a Kinetické parametry byly vždy stanoveny pouze u majoritní enzymové aktivity

4.3. Transglykosylační reakce

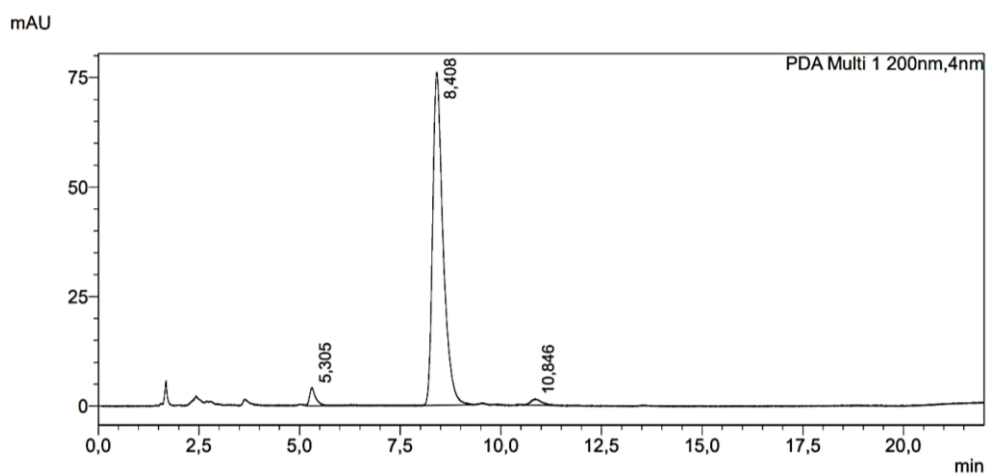
4.3.1. Příprava disacharidu β -D-GlcNAc(1→4)- β -D-GlcNAc-N₃

K optimalizaci podmínek enzymové syntézy disacharidu **2** byl použit glykosid **1** o koncentraci 500 mM. Reakce byla prováděna s mutantní β -N-acetylhexosaminidasou *TfHex* R218K (GlcNAcasa). Reakční schéma je uvedeno v kap. 3.5.6.2. Byl sledován průběh reakcí s enzymem o aktivitě 0,1-3 U pomocí TLC (Obr. 37) a HPLC. V reakci vznikl neidentifikovaný vedlejší produkt a β -D-GlcNAc(1→4)-D-GlcNAc. V reakci obsahující 3 U enzymu vznikl především vedlejší produkt. Reakce obsahující méně než 1 U probíhaly příliš pomalu. Jako optimální byla zvoleno množství enzymu 1,5 U.

Bylo připraveno 24 mg disacharidu **2** (27 %) o čistotě 95 %, která byla stanovena pomocí HPLC (Obr. 38). Výtěžek reakce byl dvakrát vyšší než v analogické reakci s divokým kmenem *TfHex*. Z reakční směsi bylo zpět získáno 84 mg glykosidu **1**. Struktura produktu **2** byla potvrzena NMR (Příloha 2).



Obrázek 37 Analýza průběhu syntézy disacharidu **2** pomocí TLC. Deska obsahuje 6 drah se vzorky reakční směsi v čase 0–5 hodin. Jednotlivé skvrny: **A** – GlcNAc-N₃, **B** – β-D-GlcNAc(1→4)-β-D-GlcNAc-N₃ (produkt), **C** – produkt **2**, **D** – β-D-GlcNAc(1→4)-D-GlcNAc.



Obrázek 38 Chromatogram HPLC po purifikaci disacharidu **2** – čistota – 95 %. Měřila Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.

4.3.2. Příprava disacharidu 6'-O-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc

Záměrem této části práce (kap. 4.3.2. a 4.3.3.) bylo připravit směsný *N*-acetylhexosaminový oligosacharid, a tak demonstrovat využitelnost připravených selektivních mutantních variant. Původní záměr provést selektivní GalNAcylyaci nechráněné *N,N'*-diacetylchitobiosy (β -D-GlcNAc(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc) s jednou z připravených mutantních GalNAcas se ale ukázal jako nerealizovatelný. Ač byla u obou mutantních variant E546Q a E546H silně navýšena GalNAcasová aktivita, zbytková GlcNAcasová aktivita způsobovala nezanedbatelné štěpení *N,N'*-diacetylchitobiosového akceptoru a vznik směsi produktů. Zde navržená metoda selektivní protekce akceptoru na C-6 snížila afinitu enzymů k akceptoru asi 6 \times , což bylo dostačující pro provedení selektivní GalNAcylyace.

Dle literatury [70] byl napřed připraven prekurzor *p*NP-6-*O*-Ac- β -D-GlcNAc (**4**) pro přípravu selektivně chráněného disacharidu **6** (schéma viz kap. 3.5.6.3). Z 200 mg *p*NP-GlcNAc (**3**) bylo připraveno 230 mg 6-*O*-acetylovaného donoru **4**, což odpovídá 99% výtěžku. Čistota donoru **4** byla ověřena pomocí HPLC (Obr. 40) a struktura pomocí NMR (Příloha 2).

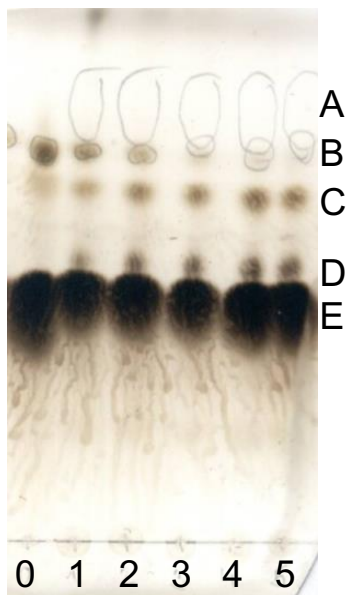
Pro zvolení optimálních podmínek enzymové syntézy disacharidu **6** byly provedeny analytické transglykosylační reakce donoru **4** o koncentraci 30 mM a akceptoru D-GlcNAc (**5**) o koncentraci 300 mM a 500 mM. Optimalizováno bylo také množství enzymu *Tf*Hex R218K v reakční směsi.

Průběh reakcí byl sledován pomocí TLC a HPLC. Bylo zjištěno, že v přítomnosti 500mM akceptoru vznikalo více transglykosylačního produktu než s menší koncentrací akceptoru, kdy vznikalo více hydrolytického produktu 6-*O*-Ac-D-GlcNAc. Byl studován průběh reakce s mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasou *Tf*Hex R218K o aktivitě 0,5–7 U/ml. Vyšší obsah enzymu v reakční směsi negativně neovlivnil poměr hydrolýzy a transglykosylace, pouze urychlil její průběh, na optimální délku reakce 4-6 hodin.

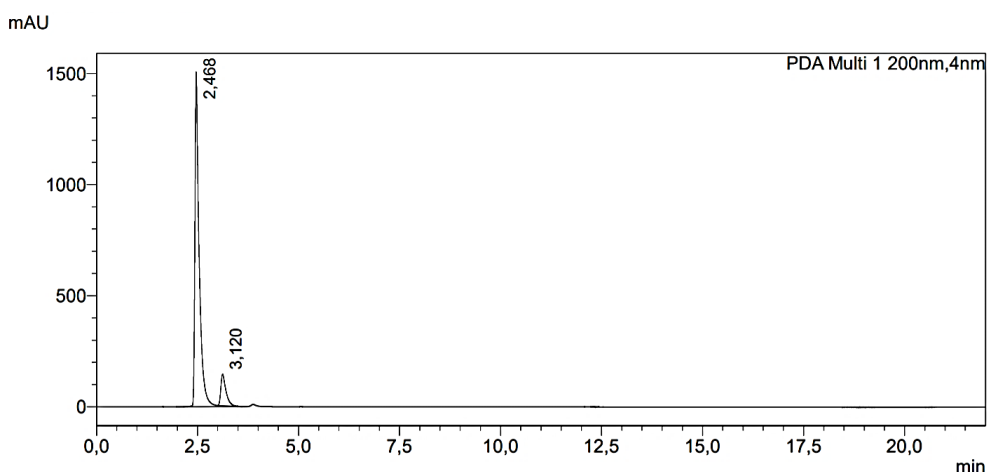
Jako nejvhodnější byla zvolena koncentrace akceptoru GlcNAc 500 mM, donoru *p*NP-6-*O*-Ac- β -D-GlcNAc 30 mM a *Tf*Hex R218K o aktivitě 7 U/ml. Pro lepší rozpustnost byl do reakční směsi přidán 30% acetonitril. Reakce probíhala při 35 °C a 850 ot./min. Obr. 12). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (Obr. 39) a HPLC (Obr. 41) a po spotřebování donoru byla reakce ukončena (v čase 5 hodin). Po ukončení reakce byla

směs centrifugována a purifikována gelovou permeační chromatografií. Separované produkty byly zlyofilizovány a stanovena jejich čistota pomocí HPLC. Struktura produktu **6** byla potvrzena NMR (Příloha 2).

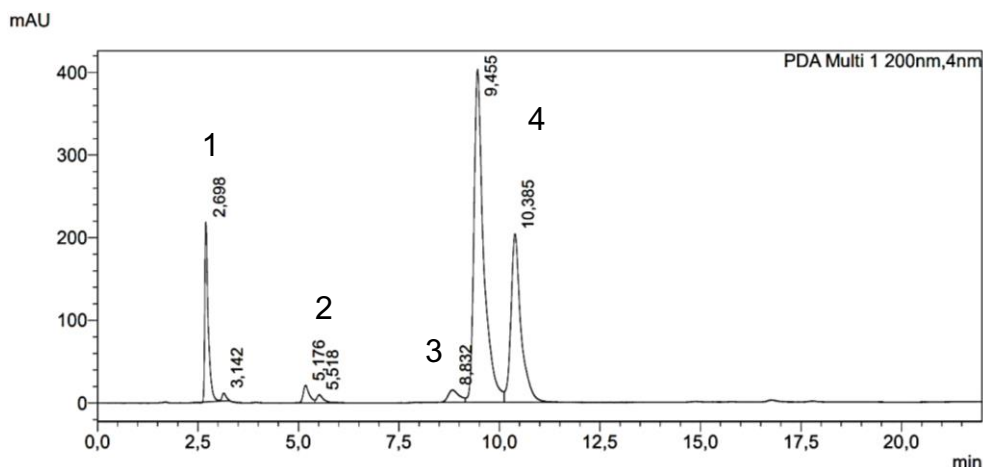
Bylo připraveno 14 mg disacharidu **6** (výtěžek 23 %) o čistotě 82 % (Obr. 42). Disacharid **6** byl následně použit jako akceptor pro selektivní GalNAcylation (kap. 4.3.3.).



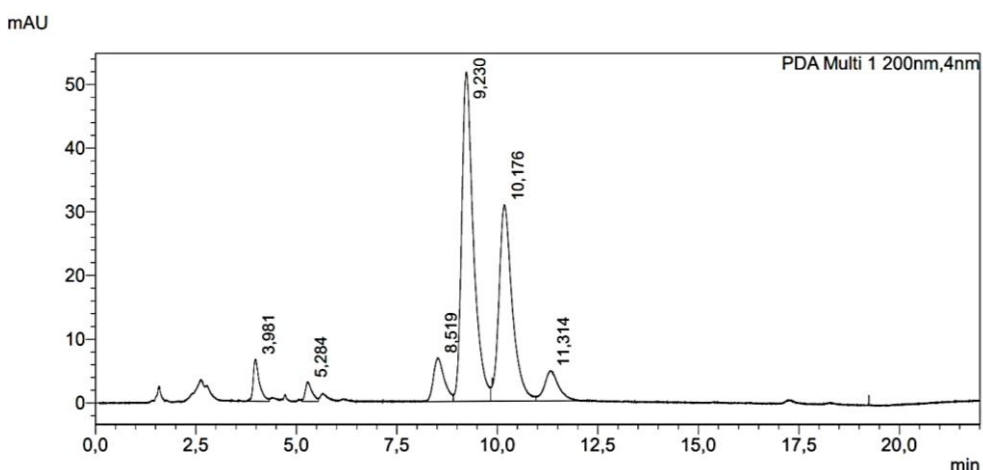
Obrázek 39 Analýza průběhu syntézy disacharidu **6** pomocí TLC. Deska obsahuje 6 drah se vzorky reakční směsi v čase 0–5 hodin. Jednotlivé skvrny: **A** – *p*-nitrofenol, **B** – *p*NP-6-*O*-Ac-GlcNAc (donor), **C** – 6-*O*-Ac-GlcNAc, **D** – 6'-*O*-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc (produkt), **E** – GlcNAc (akceptor).



Obrázek 40 HPLC chromatogram připraveného prekursoru **4** – čistota 100 %. Měřila Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.



Obrázek 41 Chromatogram HPLC – analytická transglykosylační reakce. Vzorek z 3 hodin reakce, **1** *p*NP-OH, **2** 6-*O*-Ac-GlcNAc, **3** produkt - disacharid **6**, **4** GlcNAc. Měřila Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.



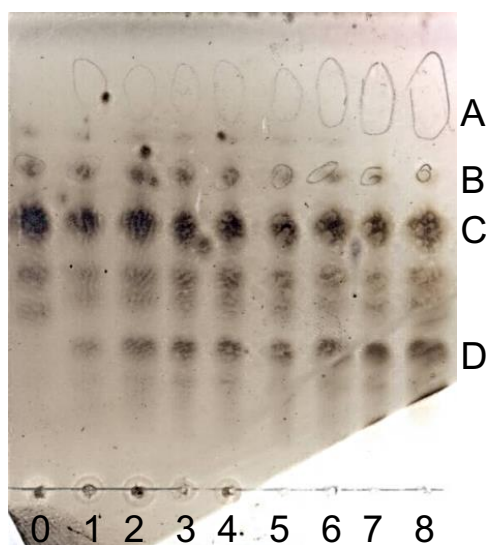
Obrázek 42 HPLC chromatogram disacharidu **6** po purifikaci – čistota 82 %. Měřila Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.

4.3.3. Příprava trisacharidu β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-6'-*O*-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc

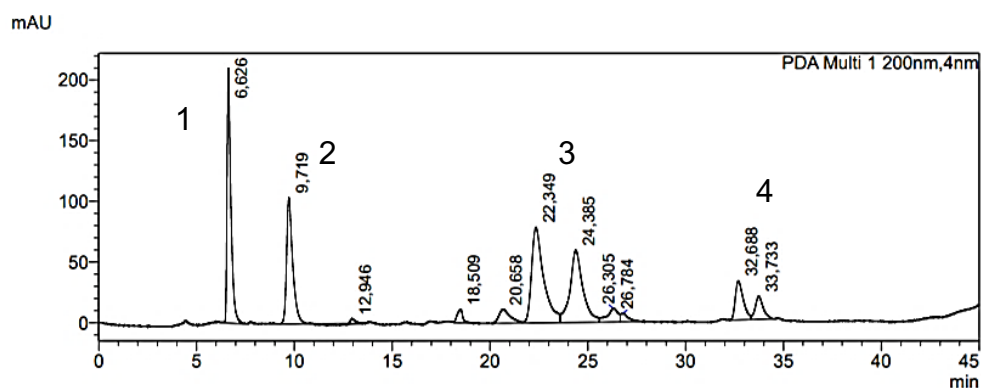
Pro přípravu trisacharidu **8** (Obr. 13) bylo optimalizováno množství akceptoru **6** a mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasy E546Q. Byly provedeny analytické reakce donoru **7** o koncentraci 30 mM a akceptoru **6** o koncentraci 100 mM a 250 mM. V reakční směsi obsahující 100mM akceptorem vznikalo více transglykosylačního produktu. V analytických reakcích byl použit enzym o aktivitě 2,5 U/ml, tato hodnota se na první pokus jevila jako optimální.

Pro preparativní uspořádání byly zvoleny optimální podmínky reakce, koncentrace aktceptoru **6** 100 mM, donoru **7** 30 mM a *Tj*Hex E546Q o aktivitě 2,5 U/ml (Obr. 13). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (Obr. 43), tím byl určen čas zastavení reakce. Reakce byla ukončena varem po 8 hodinách, kdy byl zreagován téměř veškerý donor. Produkt byl identifikován pomocí a HPLC/MS (Obr. 44).

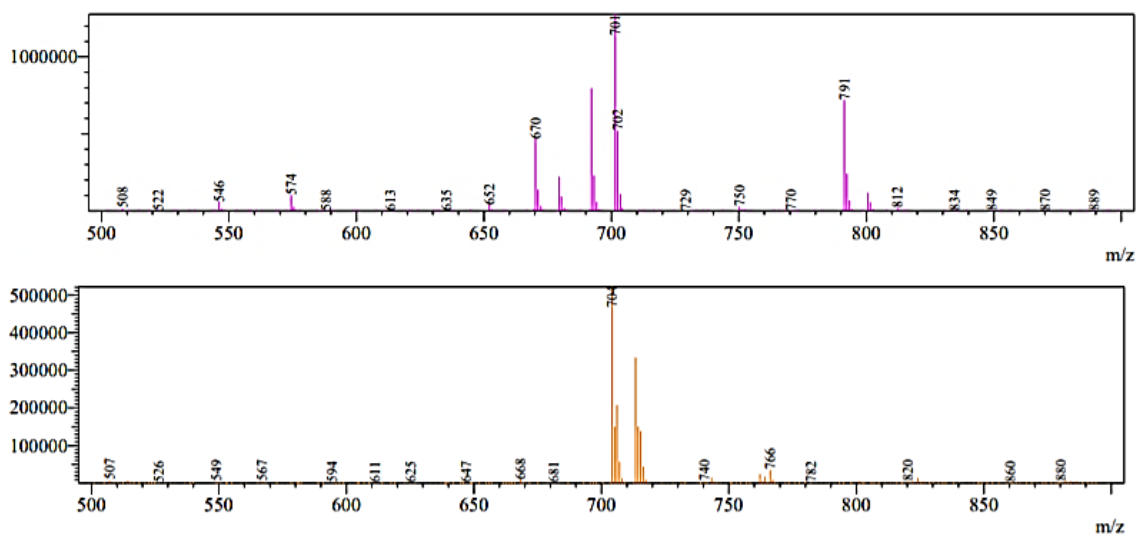
Po ukončení reakce byla směs centrifugována a purifikována gelovou permeační chromatografií. Separované produkty byly zlyofilizovány a stanovena jejich čistota pomocí HPLC ve spolupráci z kolegy v laboratoři. Bylo připraveno 6,6 mg disacharidu **6** (výtěžek 28 %) o čistotě 90 % (Obr. 46).



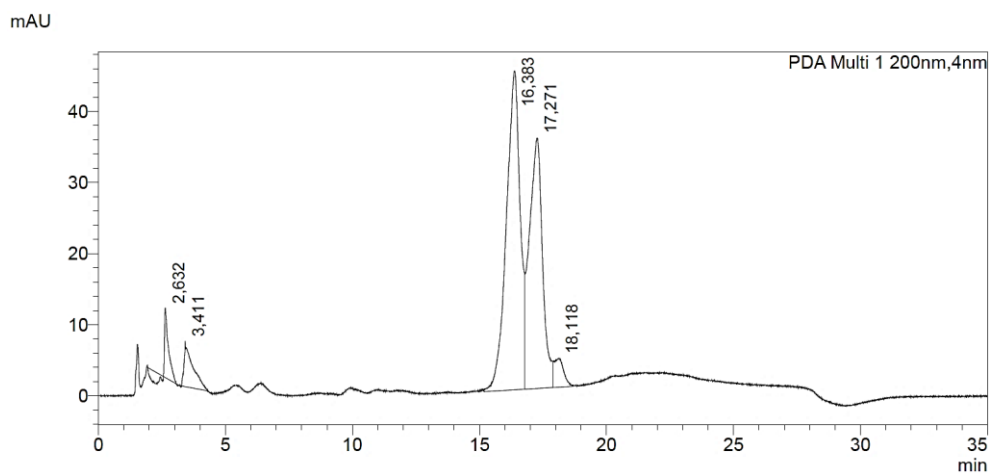
Obrázek 43 Analýza průběhu syntézy trisacharidu **8** pomocí TLC. Deska obsahuje 9 drah se vzorky reakční směsi v 0 – 8 hodině. Jednotlivé skvrny: **A** – *p*-nitrofenol, **B** – *p*NP-β-D-GalNAc (donor), **C** – 6'-*O*-Ac-β-D-GlcNAc-(1→4)-D-GlcNAc, **D** – β-D-GalNAc-(1→4)-6'-*O*-Ac-β-D-GlcNAc-(1→4)-D-GlcNAc (produkt).



Obrázek 44 Chromatogram HPLC – analytická transglykosylační reakce. Vzorek z 3,5 hodin reakce, **1** *p*NP-OH, **2** *p*NP-GalNAc, **3** 6'-*O*-Ac-GlcNAc, **4** produkt - trisacharid **8**.
Měřila Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.



Obrázek 45 Hmotnostní spektrum píku ve 32,7 minutě. Nahoře pozitivní mód $[M+H]^+$ 670, $[M+H+CH_3OH]^+$ 702. Dole negativní mód $[M-H]^-$ 668, $[M-H+Cl]^-$ 704. Měřila Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.



Obrázek 46 HPLC chromatogram trisacharidu **8** po purifikaci – čistota 90 %. Měřila Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.

5. ZÁVĚR

V rámci předkládané práce byly získány původní výsledky týkající se analýzy vztahu bodových mutací v nukleotidové sekvenci genu kódujícího β -*N*-acetylhexosaminidasu z *Talaromyces flavus* (TfHex) a poměru GalNAcasové/GlcNAcasové aktivity exprimovaného mutantního enzymu. Byly analyzovány celkem tři bodové mutace v aktivním centru enzymu: R218K, E546Q a E546H. Mutantní enzym TfHex E546H byl připraven ze syntetického genu elektroporací do kompetentních buněk *Pichia pastoris*, produkován, purifikován a byly charakterizovány jeho biochemické parametry. Zbývající dva mutanty (E546Q a R218K) byly produkovány z dříve připravených kryokonzervovaných kultur *P. pastoris*, nesoucích příslušný mutantní gen. Tyto enzymy byly taktéž purifikovány a charakterizovány. U mutantních variant TfHex E546H a E546Q došlo k navýšení GalNAcasové aktivity 5-6 \times (lze tedy hovořit o GalNAcasách), zatímco u varianty TfHex R218K došlo k osminásobnému zvýšení selektivity vůči pNP-GlcNAc, jedná se tedy o GlcNAcasu.

Pomocí mutantních β -*N*-acetylhexosaminidas byly připraveny tři oligosacharidy, β -D-GlcNAc(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-N₃, 6'-*O*-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc a β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-6'-*O*-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc. Transglykosylačními reakcemi byla ověřena široká substrátová specifita připravených mutantních β -*N*-acetylhexosaminidas a též možnost využití jejich zvýšené selektivity pro přípravu komplexních *N*-acetylhexosaminů, jako je uvedený trisacharid.

Citovaná literatura

- [1] P. Fialová a V. Křen, „Enzymatic approaches to O-glycoside introduction: Glycosidases,“ v *Comprehensive Glycoscience*, Oxford, Elsevier Ltd, **2007**, pp. 453-487.
- [2] L. Weignerová, E. Rajnochová-Herkommerová a V. Křen, „Enzymová reverzní glykosilace,“ *Chemické Listy*, č. 93, pp. 781-787, **1999**.
- [3] D. H. Crout a G. Vic, „Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis,“ *Current Opinion in Chemical Biology*, č. 2, pp. 989-111, **1998**.
- [4] T. V. Vuong a D. B. Wilson, „Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity,“ *Biotechnology and Bioengineering*, č. 107, pp. 195-205, **2010**.
- [5] P. Bojarová a V. Křen, „Glycosidases: a key to tailored carbohydrates,“ *Trends in Biotechnology*, č. 27, pp. 199 - 209, **2008**.
- [6] D. L. Zechel a S. G. Withers, „Glycosidase mechanism: anatomy of a finely tuned catalyst,“ *Accounts of Chemical Research*, č. 33, pp. 11-18, **2000**.
- [7] B. L. Mark a M. N. G. James, „Anchimeric assistance in hexosaminidases,“ *Canadian Journal of Chemistry*, č. 80, pp. 1064-1074, **2002**.
- [8] K. Slámová, P. Bojarová, L. Petrásková a V. Křen, „-N-acetylhexosaminidase: What's in a name... ?,“ *Biotechnology Advances*, č. 28, pp. 682-693, **2010**.
- [9] M. M. Palcic, „Glycosyltransferases as biocatalysts,“ *Current Opinion in Chemical Biology*, č. 15, pp. 226-233, **2011**.
- [10] S. H. Choi, H. S. Kim, Y. J. Yoon, D.-M. Kim a E. Y. Lee, „Glycosyltransferase and its application to glycodiversification of natural products,“ *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, č. 18, pp. 1208-1212, **2012**.

- [11] C. A. Weijers, M. C. Franssen a G. M. Visser, „Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides,“ *Biotechnology Advances*, č. 26, pp. 426-456, **2008**.
- [12] P. Bojarová, „Glykosyltransferasy,“ *Biochemie a biomedicína sacharidů*, **2018**.
- [13] P. Bojarová, „Glykosidhydrolasy,“ *Biochemie a biomedicína sacharidů*, **2018**.
- [14] M. Li, L. Zhou, M. Liu, Y. Huang, X. Sun a F. Lu, „Construction of an engineering strain producing high yields of α -transglucosidase via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus niger*,“ *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, č. 77, pp. 1860-1866, **2013**.
- [15] V. Puchart, „Glycoside phosphorylases: Structure, catalytic properties and biotechnological potential,“ *Biotechnology Advances*, č. 33, pp. 261-276, 2015.
- [16] M. Kitaoka, „Diversity of phosphorylases in glycoside hydrolase families,“ *Applied Microbiology and Biotechnology*, č. 99, pp. 8377-8390, **2015**.
- [17] L. F. Mackenzie, Q. Wang, R. A. J. Warren a S. G. Withers, „Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis,“ *Journal of the American Chemical Society*, č. 120, pp. 5583-5584, **1998**.
- [18] C. Malet a A. Planas, „From β -glucanase to β -glucan synthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile,“ *FEBS Letters*, č. 440, p. 208–212, **1998**.
- [19] M. D. Vaughan, K. Johnson, S. DeFrees, X. Tang, R. A. J. Warren a S. G. Withers, „Glycosynthase-mediated synthesis of glycosfingolipid,“ *Journal of the American Chemical Society*, č. 128, pp. 6300-6301, **2006**.
- [20] H. Lin, H. Tao a V. W. Cornish, „Directed evolution of a glycosynthase via chemical complementation,“ *Journal of the American Chemical Society*, č. 126, pp. 15051-15059, **2004**.

- [21] C. Li a L.-X. Wang, „Chemoenzymatic methods for the synthesis of glycoproteins,“ *Chemical Reviews*, č. 118, p. 8359–8413, **2018**.
- [22] P. M. Danby a S. G. Withers, „Advances in enzymatic glycoside synthesis,“ *ACS Chemical Biology*, č. 11, pp. 1784-1794, **2016**.
- [23] <https://enzyme.expasy.org/>.
- [24] Oficiální webová stránka celosvětově uznávané databáze CAZY <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>.
- [25] K. A. Stubbs, M. Balcewich, B. L. Mark a D. J. Vocadlo, „Small molecule inhibitors of a attenuate inducible AmpC-mediated β -lactam resistance,“ *Journal of Biological Chemistry*, č. 282, pp. 21382-21391, **2007**.
- [26] J.-P. Bacik, G. E. Whitworth, K. A. Stubbs, D. J. Vocadlo a B. L. Mark, „Active site plasticity within the glycoside hydrolase NagZ underlies a dynamic mechanism of substrate distortion,“ *Chemistry & Biology*, č. 19, pp. 1471-1482, **2012**.
- [27] B. Cournoyer a D. Faure, „Radiation and functional specialization of the family-3 glycoside hydrolases,“ *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, č. 5, pp. 190-198, **2003**.
- [28] A. J. Harvey, M. Hrmova, R. De Gori, J. N. Varghese a G. B. Fincher, „Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases,“ *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, č. 41, pp. 257-269, **2000**.
- [29] I. Tews, A. Perrakis, A. Oppenheim, Z. Dauter, K. S. Wilson a C. E. Vorgias, „Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease,“ *Nature structural biology*, č. 3, pp. 638-648, **1996**.
- [30] M. J. Lemieux, B. L. Mark, M. M. Cherney, S. G. Withers, D. J. Mahuran a M. N. G. James, „Crystallographic structure of human β -hexosaminidase A: interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis,“ *Journal of Molecular Biology*, č. 359, pp. 913-929, **2006**.

- [31] B. L. Mark, D. J. Vocadlo, S. Knapp, B. L. Triggs-Raine, S. G. Withers a M. N. G. James, „Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial β -hexosaminidase,“ *The Journal of Biotechnological Chemistry*, č. 276, pp. 10330-10337, **2001**.
- [32] K. Slámová, P. Bojarová, D. Gerstorferová, B. Fliedrová, J. Hofmeisterová, M. Fiala, P. Pompach a V. Křen, „Sequencing, cloning and high-yield expression of a fungal β -N-acetylhexosaminidase in *Pichia pastoris*,“ *Protein Expression and Purification*, č. 82, pp. 212-217, **2012**.
- [33] E. Ficko-Blean a A. B. Boraston, „The interaction of a carbohydrate-binding module from a *Clostridium perfringens* N-acetyl-beta-hexosaminidase with its carbohydrate receptor.,“ *Journal of Biological Chemistry*, č. 281, pp. 37748-37757, **2006**.
- [34] R. Dennis, E. Taylor, M. Macauley, K. Stubbs, J. Turkenburg, S. Hart, G. Black, D. Vocadlo a G. Davies, „Structure and mechanism of a bacterial β -glucosaminidase having O-GlcNAcase activity,“ *Nature Structural & Molecular Biology*, č. 13, pp. 365-371, **2006**.
- [35] F. V. Rao, H. C. Dorfmueller, F. Villa, M. Allwood, I. M. Eggleston a D. M. F. van Aalten, „Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis,“ *The European Molecular Biology Organization Journal*, č. 25, pp. 1569-1577, **2006**.
- [36] O. Plíhal, J. Sklenář, K. Hofbauerová, P. Novák, P. Man, P. Pompach, D. Kavan, H. Ryšlavá, L. Weignerová, A. Charvátová-Pišvejcová, V. Křen a K. Bezouška, „Large propeptide of fungal β -N-acetylhexosaminidases are novel enzyme regulators that must be intracellularly processd to control activity dinerization, and secretion into the extracellular enviroment,“ *Biochemistry*, č. 46, pp. 2719-2734, **2007**.

- [37] N. Ramasubbu, L. M. Thomas, C. Rafunath a J. B. Kaplan, „Structural Analysis of Dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*,“ *Journal of Molecular Biology*, č. 349, pp. 475-486, **2005**.
- [38] J. B. Kaplan, C. Ragunath, N. Ramasubbu a D. H. Fine, „Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by and endogenous β -hexosaminidase activity,“ *Journal of Bacteriology*, č. 185, pp. 4693-4698, **2003**.
- [39] B. H. Jagadeesh, T. N. Prabha a K. Srinivasan, „Activities of glycosidases during fruit development and ripening of tomato (*Lycopersicum esculantum* L.): implication in fruit ripening,“ *Plant Science*, č. 166, pp. 1451-1459, **2004**.
- [40] B. H. Jagadeesh, T. N. Prabha a K. Srinivasan, „Activities of β -hexosaminidase and α -mannosidase during development and ripening of bell capsicum (*Capsicum annuum* variata),“ *Plant Science*, č. 167, pp. 1263-1271, **2004**.
- [41] A. Oikawa, E. Itoh, A. Ishihara a H. Iwamura, „Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase from maize seedlings,“ *Journal of Plant Physiology*, č. 160, pp. 991-999, **2003**.
- [42] D. J. Adams, „Fungal cell wall chitinases and glucanases,“ *Microbiology*, č. 150, pp. 2029-2035, **2004**.
- [43] D. M. Rast, D. Baumgartner, C. Mayer a G. O. Hollensterin, „Cell wall-associated enzymes in fungi,“ *Phytochemistry*, č. 64, pp. 339-366, **2003**.
- [44] D. M. Rast, M. Horsch, R. Furter a G. W. Gooday, „A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function,“ *Journal of General Microbiology*, č. 137, pp. 2797-2810, **1991**.

- [45] R. Ettrich, V. Kopecký Jr., K. Hofbauerová, V. Baumruk, P. Novák, P. Pompach, P. Man, O. Plíhal, M. Kutý, N. Kulik, J. Sklenář, H. Ryšlavá, V. Křen a K. Bezouška, „Structure of the dimeric N-glycosylated form of fungal β -N-acetylhexosaminidase revealed by computer modeling, vibrational spectroscopy, and biochemical studies,“ *BMC Structural Biology*, č. 7, pp. 32-46, **2007**.
- [46] O. Plíhal, J. Sklenář, J. Kmoníčková, P. Man, P. Pompach, V. Havlíček a K. Bezouška, „N-glycosylated catalytic unit meets O-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase,“ *Biochemical Society Transactions*, č. 32, pp. 764-765, **2004**.
- [47] K. Zitta, E. V. Wertheimer a P. V. Miranda, „Sperm N-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida,“ *Molecular Human Reproduction*, č. 12, pp. 557-563, **2006**.
- [48] P. V. Miranda, F. Gonzáles-Echeverría, J. A. Blaquier, D. J. Mahuran a J. G. Tezón, „Evidence for the participation of β -hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction *in vitro*,“ *Molecular Human Reproduction*, č. 6, pp. 699-706, **2000**.
- [49] S. L. Perez Martinez, R. J. Menendez Helman, K. S. Zitta, A. Brandelli a P. V. Miranda, „Characterization of human sperm N-acetylglucosaminidase,“ *International Journal of Andrology*, č. 31, pp. 315-324, **2006**.
- [50] J. Krejzová, N. Kulik, K. Slámová a V. Křen, „Expression of human β -N-acetylhexosaminidase B in yeast eases the search for selective inhibitors,“ *Enzyme and Microbial Technology*, č. 89, pp. 1-6, **2016**.
- [51] D. J. Mahuran, „Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses,“ *Biochimica et Biophysica Acta*, č. 1455, pp. 105-138, **1999**.
- [52] Y. Hou, R. Tse a M. D. J., „Direct determination of the substrate specificity of the alpha-active site in heterodimeric beta-hexosaminidase A,“ *Biochemistry*, č. 35, pp. 3963-3969, **1996**.

- [53] M. G. Alteen, V. Oehler, I. Nemčovičová, I. B. H. Wilson, D. J. Vocadlo a T. M. Gloster, „Mechanism of human nucleocytoplasmic hexosaminidase D,“ *Biochemistry*, č. 55, pp. 2735-2747, **2016**.
- [54] M. Pásztói, B. Sódar, P. Misják, K. Pálóczi, Á. Kittel, K. Tóth, K. Wellinger, P. Géher, G. Nagy, T. Lakatos, A. Falus a E. I. Buzás, „The recently identified hexosaminidase D enzyme substantially contributes to the elevated hexosaminidase activity in rheumatoid arthritis,“ *Immunology Letters*, č. 149, pp. 71-76, **2013**.
- [55] I. Braidman, M. Carroll a D. Robinson, „Characterisation of human *N*-acetyl- β -hexosaminidase C,“ *FEBS letters*, č. 41, pp. 181-184, **1974**.
- [56] Y. Gao, L. Wells, F. I. Comer, G. J. Parker a G. W. Hart, „Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. cloning and characterization of a neutral, cytosolic β -*N*-acetylglucosaminidase from Human Brain,“ *The Journal of Biological Chemistry*, č. 276, pp. 9838-9845, **2001**.
- [57] G. W. Hart, M. P. Housley a C. Slawson, „Cycling of O-linked β -*N*-acetylglucosamine of nucleocytoplasmic proteins,“ *Nature*, č. 446, pp. 1017-1022, **2007**.
- [58] S. A. Yuzwa, M. S. Macauley, J. E. Heinonen, X. Shan, R. J. Dennis, Y. He, G. E. Whitworth, K. A. Stubbs, E. J. McEachern, G. J. Davies a D. J. Vocadlo, „A potent mechanism inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo,“ *Nature Chemical Biology*, č. 4, pp. 483-490, **2008**.
- [59] A. Stolk a R. Samsonm, „The Genus *Talaromyces*, Studies on *Talaromyces* and related genera II,“ *Studies in Mycology*, č. 2, **1972**.
- [60] J. Panek a M. Frac, „Development of a qPCR assay for the detection of heat-resistant *Talaromyces flavus*,“ *International Journal of Food Microbiology*, č. 270, pp. 44-51, **2018**.

- [61] N. Yilmaz, C. Visagie, J. Houbraken, J. Frisvad a R. Samson, „Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*,“ *Studies in Mycology*, č. 78, pp. 175-341, **2014**.
- [62] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.
- [63] H. Ryšlavá, A. Kalendová, V. Doubnerová, P. Skočdopol, V. Kumar, Z. Kukačka, P. Pompach, O. Vaněk, K. Slámová, P. Bojarová, N. Kulik, R. Ettrich, V. Křen a K. Bezouška, „Enzymatic characterization and molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal β -*N*-acetylhexosaminidase,“ *FEBS Journal*, č. 278, pp. 2469-2484, **2011**.
- [64] N. Kulik, K. Slámová, R. Ettrich a V. Křen, „Computational study of β -*N*-acetylhexosaminidase from *Talaromyces flavus*, a glycosidase with high substrate flexibility,“ *BMC Bioinformatics*, č. 16, pp. 28-43, **2015**.
- [65] GenBank, „<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEQ33603>“.
- [66] K. Slámová, J. Krejzová, P. Marhol, L. Kalachová, N. Kulik, H. Pelantová, J. Cvačka a V. Křen, „Synthesis of derivatized chitooligomers using transglycosidases engineered from the fungal GH20 β -*N*-acetylhexosaminidase,“ *Advanced Synthesis & Catalysis*, č. 357, pp. 1941-1950, **2015**.
- [67] W. Wang a B. A. Malcolm, „Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange™ site-directed Mutagenesis,“ *Biotechniques*, č. 26, pp. 680-682, **1999**.
- [68] „<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V19520>,“ **2019**.
- [69] M. M. Bradford, „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,“ *Analytical biochemistry*, č. 72, pp. 248-254, **1976**.

- [70] P. Simerská, A. Pišvejcová, M. Kuzma, P. Sedmera, V. Křen a S. Riva, „Regioselective enzymatic acylation of *N*-acetylhexosamines,“ *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, č. 29, pp. 219 - 225, **2004**.
- [71] P. Fialová, L. Weignerová, J. Rauvolfová, V. P. A. Přikrylová, R. Ettrich, M. Kuzma, P. Sedmera a V. Křen, „Hydrolytic and transglycosylation reactions of *N*-acyl modified substrates catalysed by β -*N*-acetylhexosaminidases,“ *Tetrahedron*, č. 60, pp. 693-701, **2003**.
- [72] P. Bojarová, N. Kulik, K. Slámová, M. Hubálek, M. Kotík, J. Cvačka, H. Pelantová a V. Křen, „Selective β -*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus versicolor* - a tool for producint bioactive carbohydrates,“ *Applied Microbiology and Biotechnology*, č. 103, pp. 1737-1753, **2019**.
- [73] K. Slámová a P. Bojarová, „Engineered *N*-acetylhexosamine-active enzymes in glycoscience,“ *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, č. 1861, pp. 2070-2087, **2017**.
- [74] P. Bojarová, N. Kulik, M. Hovorková, K. Slámová, H. Pelantová a V. Křen, „The β -*N*-acetylhexosaminidase in the synthesis of bioactove glycans: protein and reaction engineering,“ *Molecules*, č. 24, pp. 599-613, 2019.

Přílohy

Příloha 1 Nukleotidové sekvence β -N-acetylhexosaminidas

Klonovací místa 5' *Eco*RI a 3' *Kpn*I, plasmid pPICZ α A

*Tf*Hex WT nukleotidová sekvence

5'GTGGCCGTCAACCCTCTCCCCGCACCGCGGTTCGATCACCTGGGGCACCTCAGGTCCCATCT
CCGTGCCACACAACGTGGATGTCAAACCTGCCCAAGAACGCGATTATCAACGACGCCTGGGA
ACGCGCCTGGACGAGCATCAAGCAGTTGAGATGGGTGCCTCAGGCCACCGAGGCCCCCATC
TCGTTCGTACGAACCTTTCCGACCGTCGCGCCGACATCTGCGTCCACTGCCTCCTCTACGCCC
TTACCGTCGTCTTCGGCAGCTGCTGTTGCGGCCAGGAGCCAGAAGCGTGGCCATCAGAAGGG
CAGCCATGAGAAACGCGGCCATTACAGTCAACCCTTAGAACCGTCACGGTTACAGTCTCCG
ACCTCAATGCGGATCTACAAGCTGAAGTCGACGAGTCGTATACCCTTGTCTCGACTCCGGT
TCGTCCACACTCGCGATCACCGCCAACACCACCTGGGGTGCTTTGCACGCATTTACGACTTT
GCAGCAACTCGTGATTTATCAGGACAACAGCTTAATAATTGAGCAGCCCGTTCACATCGAGG
ATTCGCCTCTGTACCCCTGGCGCGGCGTCATGATTGACACGGGCCGAACTTTATTACTGTCC
CCAAAATCAAGGAACAGATTGATGGAATGGCGTTGTTCGAACTCAACATCTTGCATTGGCAT
TTGGATGATTTCGAGTCTTGGCCGGTGCATATGGATACATACCCTCAGATGACGAATGATGC
GTATTCGCCGTGGCAGACGTATTCGCATGAGGATATTAAGGATATTATTGAATATGCGCGTG
CGCGCGCTGTGCGTGTTGTGCCTGAAGTTGATATGCCCGGTTCATTTCGGCTGCGGGTTGGCAG
CAGGTTGATCCTAGTATTGTGCGGTGTGCTCATTCTTGGTGGTTCGAATGATAACTGGCCTTAC
CATACTGCCGTTGAGCCTACCCCCGGTCAACTCGACCCGCTCAACAACAAGACGTATGGAGT
CGTTGAGAAGGTGTACAATGAGCTTTTCGGGCATTTTCACAGATGACTTTTTCCATGTTGGTGG
TGATGAATTGCAGACTGGTTGCTACAACCTTTAGTACCTACGTGAGCGATTACCTTGCTGCCG
ACCCGAGCCGCACATACAACGACGTCACGCAGTACTGGGTTGACCATGCATTCCCTATCTTC
AAGAAGATCCAAAACCGTAAACTCGTCATCTGGGAGGATCTCATCATCAACAATCCCCACGC
ACCCAACGTGTCAACAGAAAACCTACTCGTCCAATCCTGGAACAACGGTCTCACCAACATCA
ACAACCTCACCAATTTGGGCTACGACGTCTCGTCTCTTCTTCAGACTTTATGTACCTCGACT
GCGGCTACGGAGGCTTCGTACCAACGACCCCCGATACGACGTAATGGTCAACCCAGACGC
CGTCGACGGCCTGGCAAACCTTCAACTGGGGCGGAAACGGCGGTTAGTTGGTGCACACCTAC
AAGACCTGGCAACGCATCTACGACTACGATTTTACGACCAACTTGACCGACGCGCAAGCCGC
GCATGTTAAAGGTGCTGTTGCGCCGTTGTGGTCTGAGCAGGTCGACGATACCGCGATTTCGG
GTAAGATGTGGCCTCGTGCTGCCGCGCTTGCGGAGTTGGTGTGGTCGGGAAACAAAGATCCC
AAGACCGGGGATAAGAGGACGACGTATATGACGCAGCGAATTTTGAATTTTAGAGAGTATT
TGGTTGCGAATGGTGTGCAGGCTGCGCCGTTGGTGCCCAAGTATTGCTTGCAGCATCCTCAT
TCTTGCGATTTGTACTATGATCAGACTGCGGTTGTTTGA3'

***Tf*Hex E546H nukleotidová sekvence**

5'GTGGCCGTCAACCCTCTCCCCGCACCGCGGTTCGATCACCTGGGGCACCTCAGGTCCCATCT
CCGTGCCACACAACGTGGATGTCAAACCTGCCAAGAACGCGATTATCAACGACGCCTGGGA
ACGCGCCTGGACGAGCATCAAGCAGTTGAGATGGGTGCCTCAGGCCACCGAGGCCCCCATC
TCGTTCGTACGAACCCTTTCCGACCGTCGCGCCGACATCTGCGTCCACTGCCTCCTCTACGCCC
TTACCGTTCGTCTTCGGCAGCTGCTGTTGCGGCCAGGAGCCAGAAGCGTGGCCATCAGAAGGG
CAGCCATGAGAAACGCGGCCATTACAGTCAACCCTTAGAACCCTCACGGTTACAGTCTCCG
ACCTCAATGCGGATCTACAAGCTGAAGTCGACGAGTCGTATACCCTTGTCTTCGACTCCGGT
TCGTCCACACTCGCGATCACCGCCAACACCACCTGGGGTGCTTTGCACGCATTTACGACTTT
GCAGCAACTCGTGATTTATCAGGACAACAGCTTAATAATTGAGCAGCCCGTTCACATCGAGG
ATTGCGCTCTGTACCCCTGGCGCGGCGTCATGATTGACACGGGCGGAACTTTATTACTGTCC
CCAAAATCAAGGAACAGATTGATGGAATGGCGTTGTTCGAAACTCAACATCTTGCATTGGCAT
TTGGATGATTTCGCAGTCTTGGCCGGTGCATATGGATACATACCCTCAGATGACGAATGATGC
GTATTCGCCGTGGCAGACGTATTCGCATGAGGATATTAAGGATATTATTGAATATGCGCGTG
CGCGCGCTGTGCGTGTTGTGCCTGAAGTTGATATGCCCGGTCATTTCGGCTGCGGGTTGGCAG
CAGGTTGATCCTAGTATTGTGCGGTGTGCTCATTCTTGGTGGTCGAATGATAACTGGCCTTAC
CATACTGCCGTTGAGCCTACCCCCGGTCAACTCGACCCGCTCAACAACAAGACGTATGGAGT
CGTTGAGAAGGTGTACAATGAGCTTTTCGGGCATTTTCACAGATGACTTTTTTCCATGTTGGTGG
TGATGAATTGCAGACTGGTTGCTACAACTTTAGTACCTACGTGAGCGATTACCTTGCTGCCG
ACCCGAGCCGCACATACAACGACGTCACGCAGTACTGGGTTGACCATGCATTCCCTATCTTC
AAGAAGATCCAAAACCGTAAACTCGTCATCTGGGAGGATCTCATCATCAACAATCCCCACGC
ACCCAACGTGTCAACAGAAAACCTACTCGTCCAATCCTGGAACAACGGTCTCACCAACATCA
ACAACCTCACCAATTTGGGCTACGACGTCTCTCTTCTTCAGACTTTATGTACCTCGACT
GCGGCTACGGAGGCTTCGTCACCAACGACCCCCGATACGACGTAATGGTCAACCCAGACGC
CGTCGACGGCCTGGCAAACCTTCAACTGGGGCGGAAACGGCGGTAGTTGGTGCGCACCCTAC
AAGACCTGGCAACGCATCTACGACTACGATTTTACGACCAACTTGACCGACGCGCAAGCCGC
GCATGTTAAAGGTGCTGTTGCGCCGTTGTGGTCT**CAT**CAGGTCGACGATACCGCGATTTTCGG
GTAAGATGTGGCCTCGTGCTGCCGCGCTTGCGGAGTTGGTGTGGTCGGGAAACAAAGATCCC
AAGACCGGGGATAAGAGGACGACGTATATGACGCAGCGAATTTTGAATTTTAGAGAGTATT
TGTTGCGAATGGTGTGCAGGCTGCGCCGTTGGTGCCCAAGTATTGCTTGCAGCATCCTCAT
TCTTGCGATTTGTACTATGATCAGACTGCGGTTGTTTGA3'

TfHex E546Q nukleotidová sekvence

5'GTGGCCGTCAACCCTCTCCCCGCACCGCGGTTCGATCACCTGGGGCACCTCAGGTCCCATCT
CCGTGCCACACAACGTGGATGTCAAACCTGCCAAGAACGCGATTATCAACGACGCCTGGGA
ACGCGCCTGGACGAGCATCAAGCAGTTGAGATGGGTGCCTCAGGCCACCGAGGCCCCCATC
TCGTTCGTACGAACCCTTTCCGACCGTCGCGCCGACATCTGCGTCCACTGCCTCCTCTACGCCC
TTACCGTCGTCTTCGGCAGCTGCTGTTGCGGCCAGGAGCCAGAAGCGTGGCCATCAGAAGGG
CAGCCATGAGAAACGCGGCCATTACAGTCAACCCTTAGAACCCTCACGGTTACAGTCTCCG
ACCTCAATGCGGATCTACAAGCTGAAGTCGACGAGTCGTATACCCTTGTCTCGACTCCGGT
TCGTCCACACTCGCGATCACCGCCAACACCACCTGGGGTGCTTTGCACGCATTTACGACTTT
GCAGCAACTCGTGATTTATCAGGACAACAGCTTAATAATTGAGCAGCCCGTTCACATCGAGG
ATTGCGCTCTGTACCCCTGGCGCGGCGTCATGATTGACACGGGCGGAACTTTATTACTGTCC
CCAAAATCAAGGAACAGATTGATGGAATGGCGTTGTTCGAAACTCAACATCTTGCATTGGCAT
TTGGATGATTTCGAGTCTTGGCCGGTGCATATGGATACATACCCTCAGATGACGAATGATGC
GTATTCGCCGTGGCAGACGTATTCGCATGAGGATATTAAGGATATTATTGAATATGCGCGTG
CGCGCGCTGTGCGTGTTGTGCCTGAAGTTGATATGCCCGGTCATTTCGGCTGCGGGTTGGCAG
CAGGTTGATCCTAGTATTGTGCGGTGTGCTCATTCTTGGTGGTCGAATGATAACTGGCCTTAC
CATACTGCCGTTGAGCCTACCCCCGGTCAACTCGACCCGCTCAACAACAAGACGTATGGAGT
CGTTGAGAAGGTGTACAATGAGCTTTTCGGGCATTTTCACAGATGACTTTTTTCCATGTTGGTGG
TGATGAATTGCAGACTGGTTGCTACAACTTTAGTACCTACGTGAGCGATTACCTTGCTGCCG
ACCCGAGCCGCACATACAACGACGTCACGCAGTACTGGGTTGACCATGCATTCCCTATCTTC
AAGAAGATCCAAAACCGTAAACTCGTCATCTGGGAGGATCTCATCATCAACAATCCCCACGC
ACCCAACGTGTCAACAGAAAACCTACTCGTCCAATCCTGGAACAACGGTCTCACCAACATCA
ACAACCTCACCAATTTGGGCTACGACGTCTCTCTTCTTCAGACTTTATGTACCTCGACT
GCGGCTACGGAGGCTTCGTCACCAACGACCCCCGATACGACGTAATGGTCAACCCAGACGC
CGTCGACGGCCTGGCAAACCTTCAACTGGGGCGGAAACGGCGGTAGTTGGTGCGCACCCTAC
AAGACCTGGCAACGCATCTACGACTACGATTTTACGACCAACTTGACCGACGCGCAAGCCGC
GCATGTTAAAGGTGCTGTTGCGCCGTTGTGGTCT **CAG** CAGGTCGACGATACCGCGATTTCGG
GTAAGATGTGGCCTCGTGCTGCCGCGTTGCGGAGTTGGTGTGGTCGGGAAACAAAGATCCC
AAGACCGGGGATAAGAGGACGACGTATATGACGCAGCGAATTTTGAATTTTAGAGAGTATT
TGTTGCGAATGGTGTGCAGGCTGCGCCGTTGGTGCCCAAGTATTGCTTGCAGCATCCTCAT
TCTTGCGATTTGTACTATGATCAGACTGCGGTTGTTTGA3'

***Tf*Hex R218K nukleotidová sekvence**

5'GTGGCCGTCAACCCTCTCCCCGCACCGCGGTTCGATCACCTGGGGCACCTCAGGTCCCATCT
CCGTGCCACACAACGTGGATGTCAAAC TGCCCAAGAACGCGATTATCAACGACGCCTGGGA
ACGCGCCTGGACGAGCATCAAGCAGTTGAGATGGGTGCCTCAGGCCACCGAGGCCCCCATC
TCGTTCGTACGAACCCTTTCCGACCGTCGCGCCGACATCTGCGTCCACTGCCTCCTCTACGCCC
TTACCGTCGTCTTCGGCAGCTGCTGTTGCGGCCAGGAGCCAGAAGCGTGGCCATCAGAAGGG
CAGCCATGAGAAACGCGGCCATTACAGTCAACCCTTAGAACCGTCACGGTTACAGTCTCCG
ACCTCAATGCGGATCTACAAGCTGAAGTCGACGAGTCGTATACCCTTGTCTCGACTCCGGT
TCGTCCACACTCGCGATCACCGCCAACACCACCTGGGGTGCTTTGCACGCATTTACGACTTT
GCAGCAACTCGTGATTTATCAGGACAACAGCTTAATAATTGAGCAGCCCGTTCACATCGAGG
ATTGCGCTCTGTACCCCTGGCGCGGCGTCATGATTGACACGGGCAA^{CAA}AAACTTTATTACTGTC
CCCAAAATCAAGGAACAGATTGATGGAATGGCGTTGTGCAAACCTCAACATCTTGCAATTGGCA
TTTGATGATTCGCAGTCTTGCGCCGGTGCATATGGATACATACCCTCAGATGACGAATGATG
CGTATTCGCCGTGGCAGACGTATTCGCATGAGGATATTAAGGATATTATTGAATATGCGCGT
GCGCGCGCTGTGCGTGTTGTGCCTGAAGTTGATATGCCCGGTCATTCGGCTGCGGGTTGGCA
GCAGGTTGATCCTAGTATTGTGCGGTGTGCTCATTCTTGGTGGTCAATGATAACTGGCCTTA
CCATACTGCCGTTGAGCCTACCCCGGTCAACTCGACCCGCTCAACAACAAGACGTATGGAG
TCGTTGAGAAGGTGTACAATGAGCTTTCGGGCATTTTTCACAGATGACTTTTTCCATGTTGGTG
GTGATGAATTGCAGACTGGTTGCTACAACCTTAGTACCTACGTGAGCGATTACCTTGCTGCC
GACCCGAGCCGCACATACAACGACGTCACGCAGTACTGGGTTGACCATGCATTCCCTATCTT
CAAGAAGATCCAAAACCGTAAACTCGTCATCTGGGAGGATCTCATCATCAACAATCCCCACG
CACCCAACGTGTCAACAGAAAACCTACTCGTCCAATCCTGGAACAACGGTCTCACCAACATC
AACAACCTCACCAATTTGGGCTACGACGTCCTCGTCTCTTCTTCAGACTTTATGTACCTCGAC
TGCGGCTACGGAGGCTTCGTACCAACGACCCCCGATACGACGTAATGGTCAACCCAGACG
CCGTCGACGGCCTGGCAAACCTTCAACTGGGGCGGAAACGGCGGTAGTTGGTGCGCACCCTA
CAAGACCTGGCAACGCATCTACGACTACGATTTTACGACCAACTTGACCGACGCGCAAGCCG
CGCATGTTAAAGGTGCTGTTGCGCCGTTGTGGTCTGAGCAGGTCGACGATACCGCGATTTTCG
GGTAAGATGTGGCCTCGTGCTGCCGCGCTTGCGGAGTTGGTGTGGTTCGGGAAACAAAGATCC
CAAGACCGGGGATAAGAGGACGACGTATATGACGCAGCGAATTTTGAATTTTAGAGAGTAT
TTGGTTGCGAATGGTGTGCAGGCTGCGCCGTTGGTGCCCAAGTATTGCTTGACGATCCTCA
TTCTTGCGATTTGTACTATGATCAGACTGCGGTTGTTTGA3'

Příloha 2 NMR analýzy připravených oligosacharidů

Měřila RNDr. Helena Pelantová, Ph.D.

β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-N₃ (2)

Instrument: Bruker Avance III 600 MHz (600.23 MHz for ¹H, 150.93 MHz for ¹³C, D₂O, 30 °C)

Experiments performed: ¹H NMR, ¹³C NMR, gCOSY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC, 1D-TOCSY.

Referencing: ¹H NMR spectrum was referenced using the residual signal of water (δ_{H} 4.732 ppm), ¹³C NMR spectrum to the signal of acetone (δ_{C} 30.50 ppm)

Table 1: ¹H and ¹³C NMR data (600.23 MHz for ¹H, 150.93 MHz for ¹³C, D₂O, 30 °C)

	Atom	δ_{C}	m.	δ_{H}	n _H	m.	J[Hz]
GlcNAc ^A	1	88.77	D	4.809	1	m	$\Sigma J = 9.1$
	2	54.76	D	3.794	1	m	
	3	72.61	D	3.794	1	m	
	4	79.26	D	3.710	1	m	
	5	76.74	D	3.653	1	ddd	9.7, 5.1, 2.1
	6	60.27	T	3.925	1	dd	12.2, 2.1
				3.733	1	dd	12.2, 5.1
	2-CO	175.06	S	-	0		
GlcNAc ^B	2-Ac	22.38 ^a	Q	2.108	3	s	
	1	101.72	D	4.648	1	d	8.5
	2	55.86	D	3.804	1	dd	10.4, 8.5
	3	73.73	D	3.628	1	dd	10.4, 8.4
	4	70.01	D	3.525	1	dd	9.8, 8.4
	5	76.19	D	3.560	1	ddd	9.8, 5.6, 2.2
	6	60.84	T	3.976	1	dd	12.4, 2.2
				3.805	1	dd	
	2-CO	174.88	S	-	0		
	2-Ac	22.40 ^a	Q	2.126	3	s	

^a ... might be interchanged

***p*NP-6-*O*-Ac- β -D-GlcNAc (4)**

Instrument: Bruker Avance III 400 MHz (399.87 MHz for ^1H , 100.55 MHz for ^{13}C , D_2O , 30 $^\circ\text{C}$)

Experiments performed: ^1H NMR, ^{13}C NMR, gCOSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC.

Referencing: ^1H NMR spectrum was referenced using the residual signal of water (δ_{H} 4.732 ppm), ^{13}C NMR spectrum to the signal of acetone (δ_{C} 30.50 ppm)

Table 1: ^1H and ^{13}C NMR data (399.87 MHz for ^1H , 100.55 MHz for ^{13}C , D_2O , 30 $^\circ\text{C}$)

Atom	δ_{C}	m.	δ_{H}	n_{H}	m.	J[Hz]
1	98.63	D	5.365	1	d	8.4
2	55.49	D	4.064	1	dd	10.3, 8.4
3	73.48	D	3.726	1	dd	10.3, 9.0
4	69.98	D	3.644	1	dd	9.7, 9.0
5	74.04	D	3.934	1	dd	9.7, 5.8, 2.4
6	63.36	T	4.479	1	dd	12.3, 2.4
			4.374	1	dd	12.3, 5.8
2-CO	175.21	S	-	0	-	
2-Ac	22.35	Q	2.035	3	s	
6-CO	174.21	S	-	0	-	
6-Ac	20.42	Q	2.122	3	s	
<i>i</i>-	161.78	S	-	0	-	
<i>o</i>-	116.74	D	7.201	2	m	
<i>m</i>-	126.35	D	8.273	2	m	
<i>p</i>-	143.02	S	-	0	-	

6'-O-Ac-β-D-GlcNAc-(1→4)-D-GlcNAc (6)

Instrument: Bruker Avance III 600 MHz (600.23 MHz for ^1H , 150.93 MHz for ^{13}C , D_2O , 30 °C)

Experiments performed: ^1H NMR, ^{13}C NMR, gCOSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, 1D-TOCSY.

Referencing: ^1H NMR spectrum was referenced using the residual signal of water (δ_{H} 4.732 ppm), ^{13}C NMR spectrum to the signal of acetone (δ_{C} 30.50 ppm)

Table 1: ^1H and ^{13}C NMR data (600.23 MHz for ^1H , 150.93 MHz for ^{13}C , D_2O , 30 °C)

alpha

	Atom	δ_{C}	m.	δ_{H}	n_{H}	m.	J[Hz]
GlcNAc	1	90.76	D	5.231	1	d	3.2
	2	53.78	D	3.93	1	m	
	3	69.68	D	3.92	1	m	
	4	80.88	D	3.66	1	m	
	5	70.08	D	3.94	1	m	
	6	60.31	T	3.83	1	m	
				3.72	1	m	
	2-CO	174.63	S	-	0	-	
	2-Ac	22.14	Q	2.080	3	s	
GlcNAc	1	101.92	D	4.664	1	d	8.5
	2	55.76	D	3.82	1	m	
	3	73.55	D	3.65	1	m	
	4	70.17	D	3.564	1	dd	$\Sigma J = 18.8$
	5	73.67	D	3.78	1	m	
	6	63.73	T	4.557	1	dd	12.2, 2.4
				4.296	1	dd	12.2, 6.5
	2-CO	174.84	S	-	0	-	
	2-Ac	22.42	Q	2.118	3	s	
	6-CO	174.25	S	-	0	s	
	6-Ac	20.41	Q	2.168	3	s	

beta

	Atom	δ_C	m.	δ_H	n _H	m.	J[Hz]
GlcNAc	1	94.95	D	4.759	1	d	8.0
	2	56.29	D	3.748	1	dd	10.5, 8.0
	3	72.90	D	3.707	1	dd	$\Sigma J = 19.3$
	4	80.57	D	3.64	1	m	
	5	74.65	D	3.57	1	m	
	6	60.44	T	3.861	1	dd	11.9, 2.1
				3.69	1	m	
	2-CO	174.88	S	-	0	-	
	2-Ac	22.41	Q	2.076	3	s	
GlcNAc	1	101.96	D	4.657	1	d	8.5
	2	55.72	D	3.82	1	m	
	3	73.54	D	3.64	1	m	
	4	70.17	D	3.558	1	dd	$\Sigma J = 18.8$
	5	73.64	D	3.78	1	m	
	6	63.73	T	4.547	1	dd	12.2, 2.4
				4.296	1	dd	12.2, 6.5
	2-CO	174.85	S	-	0	-	
	2-Ac	22.42	Q	2.118	3	s	
	6-CO	174.23	S	-	0	-	
	6-Ac	20.40	Q	2.166	3	s	

β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-6'-O-Ac- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc (8)**Instrument:** Bruker Avance III 600 MHz (600.23 MHz for ^1H , 150.93 MHz for ^{13}C , D_2O , 30 $^\circ\text{C}$)**Experiments performed:** ^1H NMR, ^{13}C NMR, gCOSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, HSQC-TOCSY, 1D-TOCSY.**Referencing:** ^1H NMR spectrum was referenced using the residual signal of water (δ_{H} 4.732 ppm), ^{13}C NMR spectrum to the signal of acetone (δ_{C} 30.50 ppm)**alpha**

	Atom	δ_{C}	m.	δ_{H}	n_{H}	m.	J[Hz]
GlcNAc	1	90.57	D	5.235	1	d	3.3
	2	53.63	D	3.94 ^H	1	m	
	3	69.44	D	3.92 ^H	1	m	
	4	80.56	D	3.661	1	dd	
	5	69.93	D	3.94 ^H	1	m	
	6	60.12	T	3.824	1	dd	
				3.712	1	dd	
	2-CO	174.45	S	-	0		
	2-Ac	22.33 ^b	Q	2.084	3	s	
GlcNAc	1	101.58	D	4.672	1	d	8.2
	2	54.87	D	3.86 ^H	1	m	
	3	72.28	D	3.82 ^H	1	m	
	4	79.50	D	3.77 ^H	1	m	
	5	72.06	D	3.86 ^H	1	m	
	6	60.24	T	4.542	1	dd	12.2, 2.1
				4.137	1	dd	12.2, 6.2
	2-CO	174.59	S	-	0		
	2-Ac	22.23	Q	2.116	3	s	
	6-CO	173.86	S	-	0		
	6-Ac	20.19	Q	2.189	3	s	
GalNAc	1	101.87	D	4.581	1	d	8.4
	2	52.73	D	3.965	1	dd	
	3	70.71	D	3.813	1	dd	
	4	67.67	D	3.998	1	d	
	5	75.49	D	3.78 ^H	1	m	
	6	61.00	T	3.84 ^H	1	m	
	2-CO	174.91	S	-	0		
	2-Ac	21.96 ^b	Q	2.088 ^a	3	s	

beta

	Atom	δ_C	m.	δ_H	n_H	m.	J[Hz]
GlcNAc	1	94.77	D	4.759	1	d	7.9
	2	56.16	D	3.75 ^H	1	m	
	3	72.67	D	3.707	1	dd	
	4	80.24	D	3.646	1	dd	
	5	74.50	D	3.571	1	m	
	6	60.25	T	3.862	1	m	
				3.69 ^H	1	m	
	2-CO	174.70	S	-	0		
	2-Ac	22.22 ^b	Q	2.088	3	s	
GlcNAc	1	101.58	D	4.665	1	d	8.2
	2	54.82	D	3.85 ^H	1	m	
	3	72.25	D	3.81 ^H	1	m	
	4	79.50	D	3.77 ^H	1	m	
	5	72.06	D	3.86 ^H	1	m	
	6	60.24	T	4.531	1	dd	12.2, 2.1
				4.137	1	dd	12.2, 6.2
	2-CO	174.59	S	-	0		
	2-Ac	22.23	Q	2.116	3	s	
	6-CO	173.86	S	-	0		
	6-Ac	20.19	Q	2.189	3	s	
GalNAc	1	101.87	D	4.576	1	d	8.4
	2	52.73	D	3.965	1	dd	
	3	70.71	D	3.813	1	dd	
	4	67.67	D	3.998	1	d	
	5	75.49	D	3.78 ^H	1	m	
	6	61.00	T	3.84 ^H	1	m	
	2-CO	174.91	S	-	0		
	2-Ac	21.96 ^b	Q	2.088 ^a	3	s	

Příloha 3

Abstrakt posterového sdělení na konferenci Eurocarb 2019 (Leiden, Holandsko)

Mutant glycosidases with altered substrate specificity and their analysis

Pavlaína Nekvasilová^{1,2}, Natalia Kulik³, Vladimír Křen¹, Pavla Bojarová¹

¹ Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, CZ-14220, Praha 4, Czech Republic.

² Department of Analytical Chemistry, Charles University, Faculty of Science, Hlavova 2030/8, CZ-12843, Praha 2, Czech Republic

³ Center for Nanobiology and Structural Biology, Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Zámek 136, CZ-37333 Nové Hrady, Czech Republic.

E-mail: bojarova@biomed.cas.cz

β -*N*-Acetylhexosaminidases (EC 3.2.1.52, GH 20) are enzymes are typical retaining exo-glycosidases that *in vivo* cleavage both β -*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) or β -*N*-acetylgalactosamine (GalNAc) residues fom glycostructures¹. Under suitable reaction conditions, these enzymes are able to synthesize the glycosidic bond in good yields. Substitution of selected amino acid(s) in the active site by site-direct mutagenesis may change the enzyme's substrate specificity or suppress the hydrolytic activity of the enzyme in favor of synthesis².

We present here three new mutant variants the of β -*N*-acetylhexosaminidase from *Talaromyces flavus* (*TfHex*) with altered substrate specificity. Genetic engineering afforded selective enzymes carrying either GlcNAcase or GalNAcase activity. The respective point mutations were identified by molecular modeling. Site-directed mutants were prepared, expressed in *Pichia pastoris* and purified to homogeneity. The pH and temperature optimum and the kinetic parameters of enzymes were determined. The synthetic capabilities of the prepared mutants were demonstrated in transglycosylation reactions.

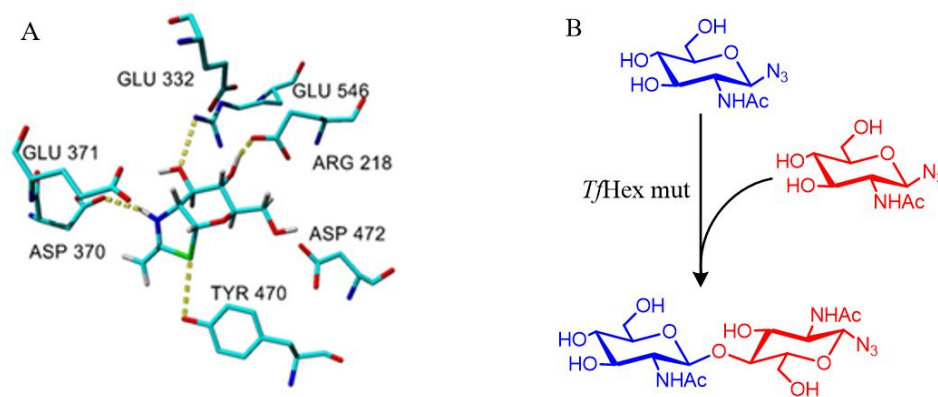


Figure 1. **A** *TfHex* active site with docked thiazoline, an β -*N*-acetylhexosaminidase inhibitor³; **B** synthetic reaction yielding β -*N*-acetylhexosamines.

Acknowledgement: Support by grant projects LTC18038 and LTC 18041 is gratefully acknowledged.

¹ K. Slámová, P. Bojarová, L. Petrásková a V. Křen, *Biotechnol. Adv.* 2010, **28**, 682-693.

² P. Bojarová, N. Kulik, M. Hovorková, K. Slámová, H. Pelantová a V. Křen, *Molecules* 2019, **24**, 599-613.

³ K. Slámová, J. Krejzová, P. Marhol, L. Kalachová, N. Kulik, H. Pelantová, J. Cvačka a V. Křen, *Adv. Syn. Cat.* 2015, **357**, 1941-1950.